



**Tiago Oliveira Matos**

Licenciado em Ciências de Engenharia Biomédica

## **Substitutos ósseos baseados em compósitos auxéticos com gradientes de funcionalidade**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges, Professor  
Associado com Agregação da Universidade Nova de Lisboa –  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Coorientador: Doutor Alexandre José da Costa Velhinho, Professor Auxiliar  
da Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e  
Tecnologia

### **Júri:**

Presidente: Doutora Carla Maria Quintão Pereira, Professora Auxiliar da  
Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e  
Tecnologia

Arguente: Doutor Jorge Alexandre Monteiro Carvalho Silva, Professor  
Associado da Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de  
Ciências e Tecnologia

Vogal: Doutor Alexandre José da Costa Velhinho, Professor Auxiliar  
da Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e  
Tecnologia

**Fevereiro, 2021**



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Substitutos ósseos baseados em compósitos auxéticos com gradientes de funcionalidade.**

Copyright © Tiago Oliveira Matos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*Um homem criativo é motivado pelo desejo  
de alcançar, não pelo desejo de vencer os  
outros.*

***Ayn Rand***



# Agradecimentos

---

Foram muitas horas de sacrifício e tempo despendido à procura de soluções e resultados, todavia nada disto seria possível sem o apoio dos meus orientadores. Portanto, quero deixar desde já os meus sinceros agradecimentos aos meus orientadores, Professor Doutor João Paulo Borges e Professor Doutor Alexandre Velhinho. Sem vocês isto não seria possível e não tenho palavras pela vossa dedicação e apoio numa fase tão difícil, transtornada e atípica que vivemos durante este semestre. Muito obrigado por me terem proporcionado esta honra de trabalhar com os professores e de me terem ensinado a crescer enquanto profissional, estudante e pessoa.

Quero deixar um enorme agradecimento aos meus colegas de laboratório, João Barroso e Filipe Lopes, por me terem acompanhado nesta longa jornada, proporcionando-me momentos únicos e inesquecíveis. Desejo-vos muito sucesso nesta nova fase da vossa vida.

Ao meu melhor amigo, Pedro Sousa, um obrigado do fundo do coração por todas as chamadas atendidas que me fizeram desabafar e aliviar muitos dos meus nervos e medos que senti durante a realização deste trabalho.

Não me posso esquecer dos meus dois grandes amigos, João Pedro Manteigas e Bruno Miguel Pereira, que me acompanharam eternamente, apoiando me nas situações mais difíceis. Muito obrigado pelos momentos que passamos juntos, por toda a disponibilidade, pela boa disposição e pelas horas que passamos a conversar junto de uma bela imperial. Escusado será dizer que merecem o melhor que o mundo pode oferecer.

Quero deixar uma especial atenção à Rafaela Raupp da Rosa e ao Diogo Saraiva por me terem auxiliado em cada instante que eu precisei de ajuda. Um enorme obrigado por toda a entreaajuda, por todo o apoio e disponibilidade que tiveram sempre comigo. Não podia pedir melhores supervisores de laboratório que vocês. Desejo-vos muita sorte para o vosso futuro.

Um mega obrigado à melhor pessoa que conheci durante este semestre. Tânia Vieira, muito obrigado por toda paciência que tiveste comigo. Obrigado por me auxiliares em cada segundo do trabalho. Do fundo do coração, obrigado pela tua simpatia e bondade, levo-te para sempre na minha memória! Mereces tudo de bom para ti e para a tua família.

Por último, o meu maior e mais emocionado agradecimento vai para toda a minha família. Aos meus pais por todo o amor e apoio incondicional! Ensinaaram-me a ser a pessoa que sou hoje, estiveram sempre do meu lado em todas as etapas da minha vida. Muito obrigado por serem as pessoas mais incríveis e extraordinárias que eu conheço. Não tenho palavras para agradecer o que fazem por mim todos os dias.



Com o aumento de doenças e fraturas ósseas cada vez existe mais interesse no desenvolvimento de biomateriais para aplicação em substituição e regeneração óssea. Materiais como a hidroxiapatite e policaprolactona são muito referidos na investigação de novos materiais compósitos biocompatíveis e bioativos para regeneração óssea.

Neste trabalho aplica-se tecnologia de impressão 3D para fabricar estruturas compósitas com comportamento auxético. Estas estruturas 3D apresentam a forma de um giróide, possuindo ainda um gradiente unidirecional de densidades. A estrutura final foi produzida através de uma mistura sólida de 70% de hidroxiapatite e 30% policaprolactona e ainda uma mistura líquida de um solvente (diclorometano), de um surfactante (2-butoxietanol) e de um plastificante (dibutilftalato).

Inicialmente, procedeu-se à otimização das misturas de modo a produzir uma estrutura 3D coesa e biocompatível. Em seguida, realizaram-se ensaios mecânicos de compressão, os quais demonstraram que as peças produzidas exibem comportamento semelhante ao de uma espuma, com módulo de Young igual a 15.9, 19.9 e 15.5 MPa e tensão de colapso igual a 0.340, 0.567 e 0.891 MPa, dependente da espessura das paredes da estrutura, 0.6, 0.8 e 1.0 milímetros, respetivamente.

Posteriormente aos ensaios de compressão, testou-se o compósito através de ensaios de bioatividade. Decorridos estes ensaios, as superfícies das amostras foram caracterizadas por Microscopia Eletrónica de Varrimento com Espectrometria de Energia Dispersiva de raios-X, SEM-EDS, para se avaliar e comparar a deposição de cristais apatíticos. Simultaneamente a estes testes, realizou-se ensaios de citotoxicidade para avaliação da biocompatibilidade. Os resultados mostraram que os materiais são bioativos e não citotóxicos, mostrando potencial para aplicação como substitutos ósseos.

**Palavras-chave:** Hidroxiapatite; Policaprolactona; Impressão 3D; Auxético; Giróide; Biocompatibilidade





With the intensification in bone diseases and fractures, there is an increasing interest in the development of biomaterials for application in bone replacement and regeneration. Materials such as hydroxyapatite and polycaprolactone are often referred to in the investigation of new biocompatible and bioactive composite materials for bone regeneration.

In this work, 3D printing technology is applied to manufacture composite structures with auxetic behaviour. These 3D structures have the shape of a gyroid, and also have a unidirectional density gradient. The final structure was produced through a solid mixture of 70% hydroxyapatite and 30% polycaprolactone and a liquid mixture of a solvent (dichloromethane), a surfactant (2-butoxyethanol) and a plasticizer (dibutyl phthalate).

Initially, the mixtures were optimized in order to produce a cohesive and biocompatible 3D structure. Then, mechanical compression tests were performed, which demonstrated that the parts produced exhibit a behavior similar to that of foam, with Young's modulus equal to 15.9, 19.9 and 15.5 MPa and collapse stress equal to 0.340, 0.567 and 0.891 MPa, dependent the thickness of the structure's walls, 0.6, 0.8 and 1.0 millimetres, respectively.

After the compression tests, the composite was tested through bioactivity tests. After these tests, the sample surfaces were characterized by Scanning Electron Microscopy with X-ray Dispersive Energy Spectrometry, SEM-EDS, to evaluate and compare the deposition of apatitic crystals. Simultaneously with these tests, cytotoxicity tests were performed to assess biocompatibility. The results showed that the materials are bioactive and non-cytotoxic, showing potential for application as bone substitutes.

**Keywords:** Hydroxyapatite; Polycaprolactone; 3D Printing; Auxetic; Gyroid; Biocompatibility



# Índice

Lista de Figuras .....	xiv
Lista de Tabelas .....	xvi
Lista de Siglas, Acrónimos e Abreviaturas .....	xviii
1. Introdução.....	1
1.1 Contextualização Temática.....	1
1.2 Objetivos Principais.....	3
1.3 Estrutura da Dissertação .....	3
2. Enquadramento Teórico .....	5
2.1 Tecido Ósseo.....	5
2.1.1 Organização do Tecido Ósseo .....	5
2.1.2 Constituição do Tecido Ósseo .....	7
2.1.3 Propriedades mecânicas do Tecido Ósseo .....	9
2.2 Biomateriais .....	10
2.2.1 Cerâmicos .....	11
2.2.2 Polímeros biodegradáveis .....	12
2.3 Hidroxiapatite.....	13
2.4 Policaprolactona.....	15
2.5 Comportamento auxético .....	16
2.5.1 Introdução .....	16
2.5.2 Coeficiente de Poisson.....	17
2.5.2 Estruturas Auxéticas .....	18
2.6 Ensaios mecânicos .....	20
2.7 Técnicas de fabrico de <i>scaffolds</i> .....	23
2.7.1 Estereolitografia (SLA).....	25
2.7.2 Sinterização seletiva por laser (SLS) .....	26

2.7.3 Impressão 3D (3DP) .....	26
2.7.4 Impressão direta por extrusão (IDE).....	27
2.7.5 Modelagem por deposição de material fundido (FDM).....	28
2.7.6 Comparação das várias técnicas de Prototipagem Rápida .....	29
3. Materiais e Métodos .....	31
3.1 Materiais.....	31
3.1.1 Produção das Amostras.....	31
3.2 Técnicas de caracterização dos pós de hidroxiapatite .....	33
3.2.1 Picnometria .....	33
3.2.2 Granulometria .....	33
3.3 Técnicas de caracterização das amostras.....	33
3.3.1 Ensaios de Reologia.....	34
3.3.2 Ensaios Mecânicos.....	34
3.3.3 <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM) .....	36
3.3.4 Ensaios de Bioatividade.....	36
3.3.5 Ensaios de Citotoxicidade.....	38
4. Análise e Discussão de Resultados.....	41
4.1 Caracterização do pó de hidroxiapatite .....	41
4.1.1 Picnometria .....	41
4.1.2 Granulometria .....	42
4.2 Desenvolvimento da pasta e produção das estruturas 3D .....	43
4.3 Ensaios mecânicos .....	49
4.4 Ensaios de bioatividade.....	54
4.5 Ensaios de Citotoxicidade .....	58
5. Conclusões e Perspetivas Futuras .....	61
5.1 Conclusões .....	61
5.2 Perspetivas Futuras.....	62
Referências Bibliográficas.....	63
Anexos .....	69

## Lista de Figuras

Figura 2.1 - Corte histológico de um osso. Adaptado de [5] .....	6
Figura 2.2 - Osso longo parcialmente seccionado. Adaptado de [5] .....	6
Figura 2.3 - Desenho da parede da diáfise dos ossos longos. Adaptado de [23] .....	7
Figura 2.4 - Origem e localização das células da MEO. Adaptado de [26] .....	8
Figura 2.5 - Evolução dos biomateriais ao longo dos anos. Adaptado de [39] .....	11
Figura 2.6 - a) Estrutura unitária da hidroxiapatite; b) Representação da estrutura da HAp ao longo do eixo c. [20] .....	13
Figura 2.7 - Substituições iónicas possíveis da HAp biológica. [26] .....	14
Figura 2.8 - Reação de polimerização do PCL. Adaptado de [50] .....	15
Figura 2.9 - Cadeia principal da policaprolactona. Adaptado de [54] .....	15
Figura 2.10 - Comparação do comportamento à deformação de materiais: (a) Material convencional; (b) Material auxético. Adaptado de [62] .....	16
Figura 2.11 - Exemplos de estruturas reentrantes: a) Estrutura de seta de ponta dupla; b) favo de mel estrelar; c) favo de mel hexagonal estruturalmente reentrante; d) rede de losangos; e) grades quadradas; f) liga- ligamentos sinusoidais. [33] .....	18
Figura 2.12 - Células tridimensionais: a) convencional; b) reentrante. [33] .....	18
Figura 2.13 - Estruturas de Schwarzita: (I, II) Primitiva; (III, IV) Giróide. [67] .....	19
Figura 2.14 - Diferentes perspetivas e tamanhos L de uma estrutura Giróide. [70] .....	20
Figura 2.15 - Curva típica de uma espuma à compressão. [75] .....	22
Figura 2.16 - Comparação entre absorção de energia: real e ideal. [75] .....	22
Figura 2.17 - Curvas de compressão de espumas com diferentes densidades. [76] .....	23
Figura 2.18 - Imagem ilustrativa do método de PR para aplicações biomédicas. Adaptado de [82] .....	24
Figura 2.19 - Esquema representativo de um equipamento de estereolitografia. Adaptado de [83] .....	25
Figura 2.20 - Representação esquemática de um equipamento de sinterização seletiva a laser. Adaptado de [83] .....	26
Figura 2.21 - Esquema de um equipamento de impressão 3D. Adaptado de [83] .....	27
Figura 2.22 - Esquema representativo de um equipamento de impressão direta por extrusão. Adaptado de [83] .....	28
Figura 2.23 - Dispositivo de impressão de modelagem por deposição de material fundido. Adaptado de [83] .....	29
Figura 3.1 - Representação lateral da peça com exposição do gradiente de densidade .....	32

Figura 3.2 - Diferentes ângulos de visualização: a) Local de injeção; b) Local de saída; c) Corte transversal.	33
Figura 3.3 - Estruturas auxéticas com diferentes espessuras: a) 1.0 mm; b) 0.8 mm; c) 0.6 mm.	34
Figura 3.4 - Máquina Autograph Shimadzu.	35
Figura 4.1 - Resultados dos ensaios de granulometria aos pós de hidroxiapatite.	42
Figura 4.2 - Curvas de fluxo da 2ª formulação para diferentes tempos.	44
Figura 4.3 - Curvas de fluxo da 3ª formulação para diferentes tempos.	44
Figura 4.4 - Curvas de fluxo da 4ª formulação para diferentes tempos.	45
Figura 4.5 - Curvas de fluxo dos três rácios entre HAp e PCL: (A) Imediatamente após produção; (B) Após 2 horas.	45
Figura 4.6 – (A) Material 90%/10% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:2:1; (B) Material 90%/10% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:4:2.	46
Figura 4.7 - (A) Material 80%/20% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:4:2; (B) Material 70%/30% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:4:2.	47
Figura 4.8 - Material 70%/30% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:4:2 com 70% de DCM evaporado.	48
Figura 4.9 - Estrutura auxética final com gradiente de densidade uniaxialmente.	48
Figura 4.10 - Curvas típicas globais Força-Deslocamento para as 4 amostras.	49
Figura 4.11 - Mecanismos de deformação dos poros. Adaptado de [97]	50
Figura 4.12 - Curva Tensão - Deformação para a amostra de 0.6 milímetros de espessura.	51
Figura 4.13 - Curva Tensão - Deformação para a amostra de 0.8 milímetros de espessura.	51
Figura 4.14 - Curva Tensão - Deformação para a amostra CC.	52
Figura 4.15 - Curva Tensão - Deformação para a amostra de 1.0 milímetros de espessura.	52
Figura 4.16 – Imagem de SEM da superfície da amostra: Controlo (A) ampliação 1500x, (B) ampliação 5000x; imersa durante 12 horas (C) ampliação 1500x, (D) ampliação 5000x; imersa durante 24 horas (E) ampliação 1500x, (F) ampliação 5000x.	55
Figura 4.17 - Imagem de SEM da superfície da amostra: imersa durante 3 dias (A) ampliação 1500x, (B) ampliação 5000x; imersa durante 7 dias (C) ampliação 1500x, (D) ampliação 5000x.	56
Figura 7.1 - Espectro retirado por EDS da amostra Controlo.	69
Figura 7.2 - Espectro retirado por EDS da amostra imersa durante 24 horas.	69
Figura 7.3 - Espectro retirado por EDS da amostra imersa durante (A) 3 e (B) 7 dias.	70

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Valores das propriedades mecânicas do osso. [13,34,35] .....	10
Tabela 2.2 - Densidades e respectivos módulos de Young do osso cortical e trabecular. [35,36] .....	10
Tabela 2.3 - Conjunto de características essenciais para a produção de um scaffold. [5,42] .....	11
Tabela 2.4 - Alguns polímeros utilizados em scaffolds, bem como algumas das suas propriedades. [19] .....	12
Tabela 2.5 - Tipos, fórmula química e relação entre Ca/P das apatites. [44] .....	14
Tabela 2.6 - Coeficiente de Poisson de alguns materiais comuns. [65].....	17
Tabela 2.7 - Fatores que diferenciam os processos de PR. [27,81,83] .....	29
Tabela 3.1 - Massa, área superficial, volume e densidade de cada uma das amostras. ....	35
Tabela 3.2 - Lista de reagentes utilizados na produção de 1L de solução de SBF. ....	37
Tabela 4.1 - Resultados dos ensaios de picnometria aos pós de hidroxiapatite.....	41
Tabela 4.2 - Resumo das características principais de cada formulação de pasta. ....	43
Tabela 4.3 – Propriedades mecânicas das estruturas submetidas a esforços de compressão. ....	53
Tabela 4.4 - Elementos químicos detetados nas superfícies das amostras pela análise de EDS. ....	57
Tabela 4.5 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade às amostras. ....	58
Tabela 4.6 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade ao pó de hidroxiapatite. ....	59
Tabela 4.7 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade ao composto 2-butoxietanol. ....	59
Tabela 4.8 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade ao composto dibutilftalato. ....	60





## Lista de Siglas, Acrónimos e Abreviaturas

ECT: Engenharia de Células e Tecidos

PR: Prototipagem rápida

Mm: Milhões de milhões

HAp: Hidroxiapatite

PCL: Policaprolactona

DCM: Diclorometano

2-Bu: 2-butoxietanol

DBP: Dibutilftalato

MEO: Matriz extracelular óssea

FCT/UNL: Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa

SEM: *Scanning Electron Microscope*

EDS: Energy Dispersive Spectroscopy

SBF: *Simulated Body Fluid*

ISO: *International Organization for Standardization*

CPN: Coeficiente de Poisson Negativo

CaP: Fosfatos de cálcio

PVA: Poli(acetato de vinilo)

HCA: Hidroxiapatite carbonatada

% wt: *Mass fraction*



# Introdução

## 1.1 Contextualização Temática

Atualmente, a ciência médica está continuamente a sofrer mudanças, pelo que novas soluções são desenvolvidas e introduzidas no mercado ano após ano. [1] Com efeito, uma das imensas necessidades na medicina atual é realizar a regeneração de tecidos e órgãos de uma forma segura e eficaz. Contudo, este procedimento é realizado maioritariamente através do recurso a transplantes, sendo que esta técnica está dependente da presença de um doador e da sua compatibilidade com o paciente em questão. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de substitutos biológicos que restabelecem, preservam ou melhoram a função de um tecido, sem recorrer ao uso de transplantes. [2]

Com o envelhecimento da população mundial, inúmeras patologias, tais como, Osteoartrose, Artrite, Reumatoide, Osteomalacia, Osteoporose, Osteopetrose, Osteoma, Doença de Paget, provocam a degradação do tecido ósseo, razão pelo qual milhões de pacientes em todo mundo são sujeitos a enxertos ósseos com vista a reparar esses mesmos defeitos. [3,4] Nos países desenvolvidos, a esperança média de vida tem vindo a aumentar e com isso existe um incremento das doenças degenerativas do tecido ósseo, o que leva a uma investigação mais acentuada para construção de implantes. Assim, cada vez mais, existe uma forte procura de biomateriais que possam obedecer os requisitos para proceder aos tratamentos necessários neste âmbito. [5]

Este trabalho vem no âmbito da junção de duas áreas distintas: Engenharia de Materiais e Engenharia de Células e Tecidos (ECT). A primeira área está diretamente relacionada com fatores desenvolvimento e caracterização dos materiais: idealização das propriedades auxéticas e desenvolvimento do implante, caracterização morfológica das superfícies das amostras, bem como ensaios mecânicos e ensaios de bioatividade. Em contrapartida, todos os estudos relacionados com a citotoxicidade e biocompatibilidade (adesão, proliferação celular, atividade metabólica) e, eventualmente, o desenvolvimento de novos tecidos é do domínio da ECT. No caso do presente trabalho, apenas foi realizada a análise de citotoxicidade.

A ECT envolve o uso de materiais biocompatíveis e biodegradáveis que atuam como matrizes para o crescimento celular, formando os chamados *scaffolds*. Estes servirão de suporte nas quais as células podem ser cultivadas com o propósito da regeneração/criação do tecido em questão. Assim sendo, a estrutura do *scaffold* fornece sustentação mecânica ao crescimento celular, bem como permite o transporte de nutrientes e outras moléculas regulatórias entre o meio extracelular e o intracelular, e vice-versa. Nos últimos anos, a ECT tem vindo a deparar-se com grandes avanços científicos na área da medicina regenerativa, desenvolvendo

variadas inovações tecnológicas para o tratamento de doenças ósseas degenerativas. Com efeito, as técnicas de prototipagem rápida (PR) foram desenvolvidas nos anos 1980 e têm vindo a sofrer uma grande evolução com o objetivo de produzir estruturas 3D onde seja possível controlar parâmetros como a forma, o tamanho e a porosidade do fabrico de *scaffolds* biocompatíveis. [6,7] A fabricação aditiva refere-se a todos os processos de fabricação que criam um objeto 3D sólido a partir dos dados de um modelo de desenho (por exemplo num ficheiro CAD) e esta fabricação é realizada geralmente camada a camada. Esta técnica fornece uma solução rápida e confiável para a fabricação de próteses específicas para o paciente, sob controle da estrutura de poros internos, da forma e da deposição espacial de vários componentes (por exemplo, fatores de crescimento, vários tipos de células ou várias composições de polímero) que, juntos, permitem uma melhor imitação do tecido-alvo. [8]

De acordo com o relatório anual mundial sobre o progresso da tecnologia de PR, produzido pela *Wohlers Associates*, a receita global da produção de PR e serviços associados cresceu de USD \$2,25 milhões de milhões em 2012 para mais de USD \$6 Mm em 2016 e a previsão é ainda para chegar aos USD \$35.6 Mm em 2024. [9,10] No último relatório de 2019, a PR chegou a atingir uma receita anual mundial de sensivelmente USD \$12 Mm. [11] Assim como a área da bioengenharia, outras áreas como a engenharia aeroespacial foi uma das indústrias onde a PR encontra inúmeras aplicações vantajosas e as principais companhias aéreas, como Airbus, Boeing, NASA Lockheed Martin, estão a investir fortemente no desenvolvimento desta tecnologia. Na verdade, para a indústria aeronáutica, um dos principais impulsionadores da melhoria é a redução de peso dos componentes de uma aeronave. Efetivamente, uma das principais vantagens da fabricação aditiva passa pelo facto de criar peças com uma geometria complexa, mais leves, bem como a consolidação de diversos componentes numa peça única. [12]

## 1.2 Objetivos Principais

Em suma, o principal objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de biomateriais compósitos com estrutura auxética e gradientes de funcionalidade, para aplicação como substitutos ósseos. As amostras são produzidas através da combinação de hidroxiapatite sintética (HAp) e policaprolactona (PCL). Assim sendo, o trabalho tem como base as seguintes etapas:

1. Desenho da estrutura auxética com gradiente de densidades;
2. Caracterização das amostras, ao nível das propriedades mecânicas através da realização de ensaios de compressão, e da sua bioatividade;
3. Avaliação da citotoxicidade dos *scaffolds* fabricados.

## 1.3 Estrutura da Dissertação

A presente dissertação é resultado de investigação no Departamento de Ciência dos Materiais, no Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL) e ainda no CENIMAT/I3N. Encontra-se dividida em seis capítulos: Capítulo 1 resume o enquadramento, a importância do tema e os objetivos deste trabalho; Capítulo 2 apresenta uma contextualização teórica ao tema; Capítulo 3 encontram-se descritos os materiais e métodos utilizados neste trabalho; Capítulo 4 analisa-se e discute-se os principais resultados obtidos; Capítulo 5 revela-se as conclusões mais pertinentes e perspetiva-se novos métodos de melhoramento deste trabalho, bem como o que falta investigar na área.



## Enquadramento Teórico

### 2.1 Tecido Ósseo

O estudo do tecido ósseo a nível anatómico e fisiológico, isto é, a sua estrutura, propriedades, bem como os seus constituintes é importante para perceber a capacidade de remodelação e regeneração óssea com vista a construir *scaffolds* apropriados à integração nestes tecidos. [13]

Apesar do tecido ósseo ter como principal função a sustentação do corpo humano, este tipo de tecido associado aos músculos possibilitam o movimento do corpo. Além disso, este é essencial na proteção de órgãos vitais internos e tem também como função a formação, desenvolvimento e maturação das células do sangue na medula óssea. [14] Funciona também como um reservatório mineral, isto é, os ossos funcionam como depósito de iões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), fosfato ( $\text{PO}^{3-}$ ), entre outros, armazenando-os ou libertando-os de maneira controlada, de modo a manter constante a concentração desses iões nos líquidos corporais. [15,16,17]

Iões como o  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{PO}^{3-}$  apresentam grande abundância no tecido ósseo e estão na forma de cristais de HAp, sendo que estes cristais são responsáveis pela dureza e rigidez do osso. O tecido ósseo armazena cerca de 99% do cálcio do corpo, para além de que este ião participa para vários processos biológicos, como permeabilidade da membrana, adesão celular, coagulação sanguínea, transmissão do impulso nervoso e contração muscular. [17]

#### 2.1.1 Organização do Tecido Ósseo

Morfológicamente, os ossos podem ser classificados em quatro tipos distintos: ossos longos, curtos, achatados ou planos e ossos irregulares. Macroscopicamente, o tecido ósseo maduro pode ser classificado como esponjoso ou trabecular e cortical ou compacto, como ilustrado na Figura 2.1. [15,17,18]

O osso compacto está localizado nas diáfises dos ossos longos e na zona externa da maioria dos ossos, caracteriza-se por ter uma baixa porosidade, por ser um tecido denso, sólido e homogéneo. [19] Este tipo de osso constitui cerca de 90% da massa óssea total. [20] Em contrapartida, o osso esponjoso encontra-se localizado na zona interna da maioria dos ossos com uma elevada porosidade que pode variar entre 50% a 90% e é composto por uma rede de trabéculas irregulares de tecido ósseo. [19]



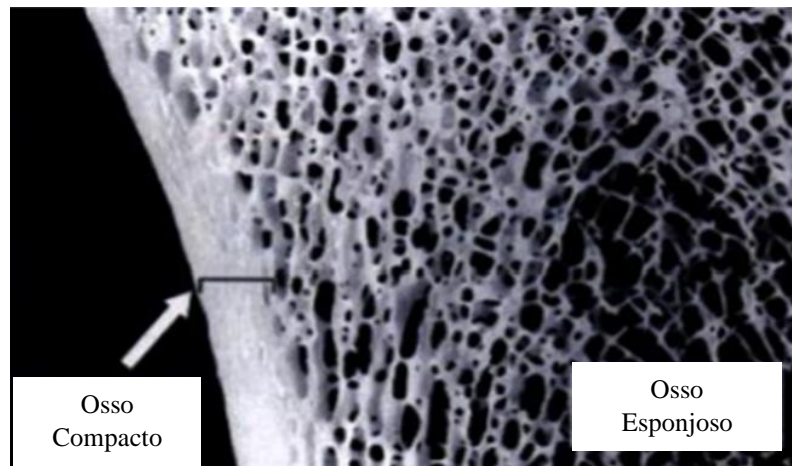


Figura 2.1 - Corte histológico de um osso. Adaptado de [5]

De referir que as quantidades de osso cortical e trabecular variam ao longo do esqueleto. No caso dos ossos longos, estes são divididos em três zonas, como ilustra a Figura 2.2: (i) epífises, são as extremidades dos ossos longos, constituídas por tecido esponjoso rodeado por uma camada fina de tecido ósseo cortical; (ii) metáfises, estas encontram-se entre as epífises e a zona intermédia, no qual é constituída abundantemente por tecido trabecular; (iii) diáfise, uma estrutura cilíndrica na porção média do osso longo, é composta por osso cortical e com uma pequena quantidade de osso esponjoso na parte mais profunda, delimitando o canal medular. [5,15,18,19]

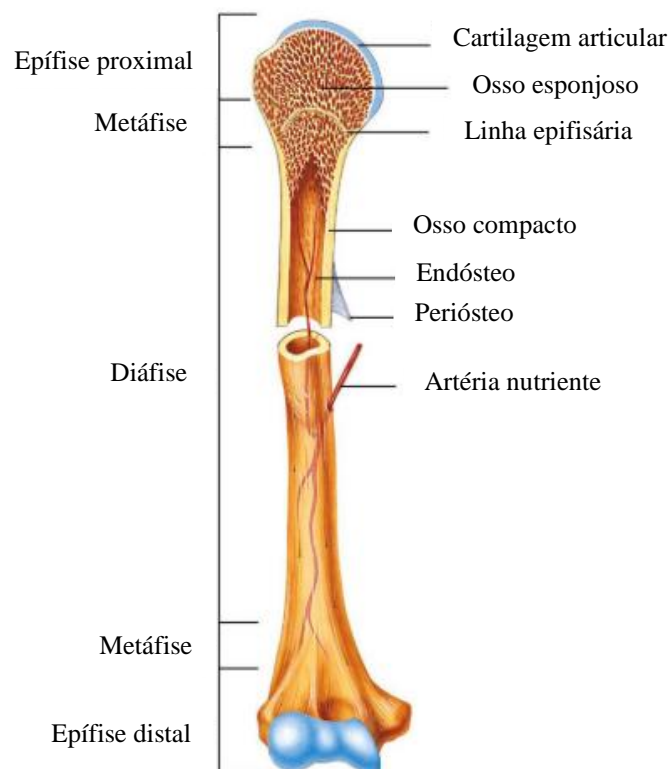
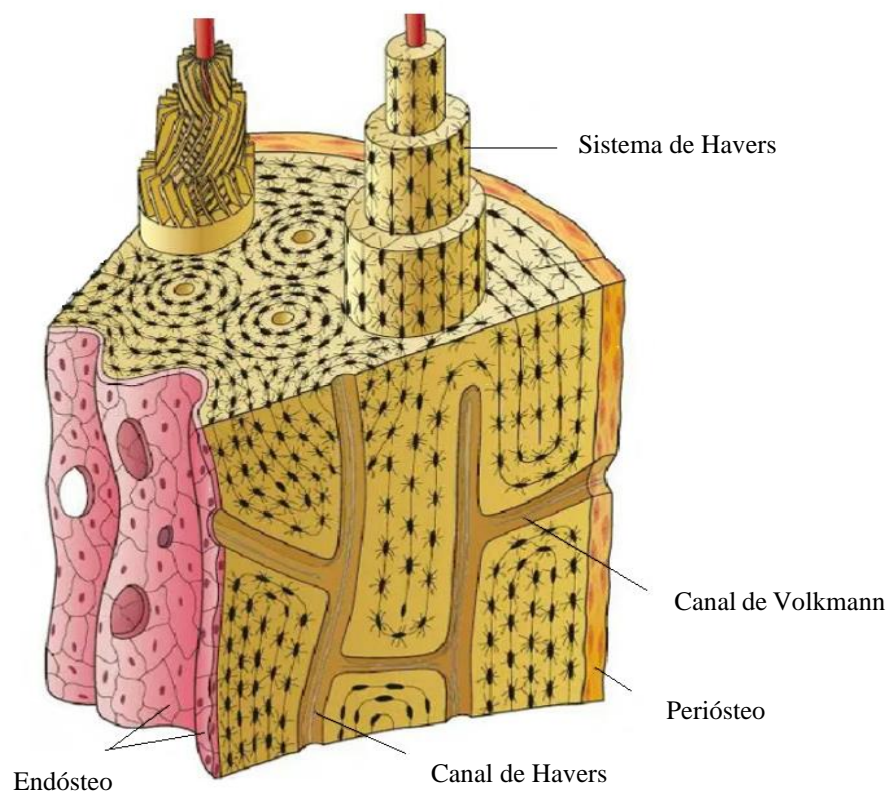


Figura 2.2 - Osso longo parcialmente seccionado. Adaptado de [5]

As superfícies externas e internas dos ossos são recobertas por células osteogénicas e tecido conjuntivo denso e fibroso, denominadas o perióstio e o endóstio, respetivamente. As principais funções destas duas superfícies são essencialmente a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos para o crescimento e recuperação do mesmo. [17,19,21]

Microscopicamente, o tecido ósseo pode ser classificado em dois tipos: primário ou imaturo (não lamelar) e secundário ou maduro (lamelar). O primário é característico por apresentar uma disposição irregular, não organizada das fibras conjuntivas e uma menor quantidade de cristais de HAp. [22] Este tecido vai sendo substituído gradualmente por tecido ósseo secundário ou maduro. [17] Este último apresenta fibras conjuntivas dispostas em lamelas paralelas de 3 a 7  $\mu\text{m}$  de espessura ou concêntricas em torno de canais com vasos sanguíneos e nervos, formando os sistemas de Havers, ilustrados na Figura 2.3. [17,23]



*Figura 2.3 -Desenho da parede da diáfise dos ossos longos. Adaptado de [23]*

### **2.1.2 Constituição do Tecido Ósseo**

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificada, a matriz extracelular óssea (MEO). Evidenciam-se quatro tipos de células que atuam na formação e remodelação óssea, sendo elas denominadas por: osteoblastos, osteócitos, células de revestimento e osteoclastos, como representado na Figura 2.4. [17,20]

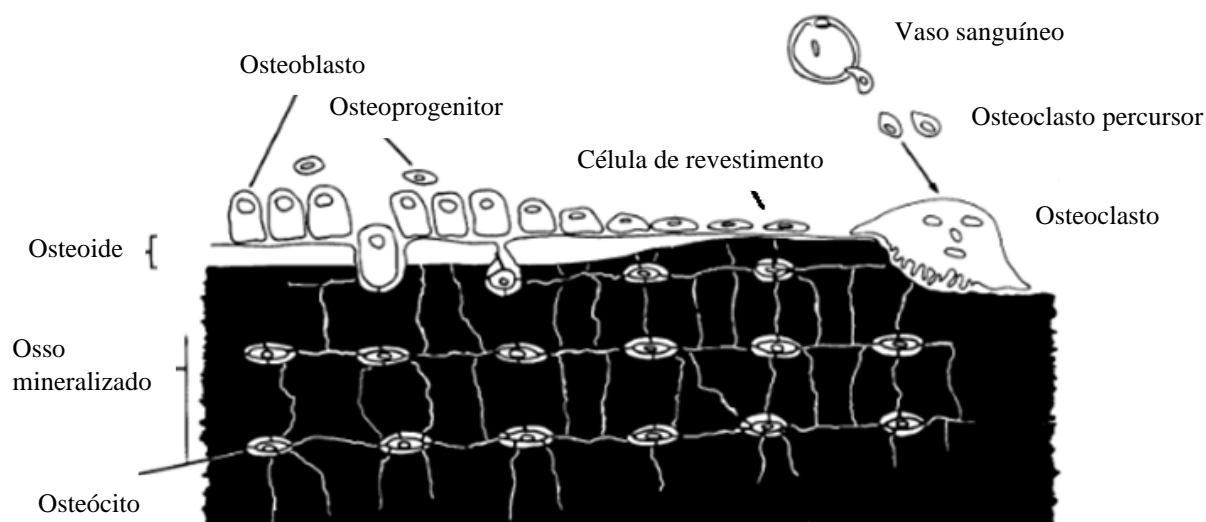


Figura 2.4 - Origem e localização das células da MEO. Adaptado de [26]

Os osteoblastos são células de origem mesenquimal, estão localizados na porção mais profunda do periósteo e endósteo na proximidade das regiões de tecido ósseo aquando a sua formação. Estas células encontram-se envolvidas na síntese da matéria orgânica descalcificada, processo este que produz grande quantidade de fosfatase alcalina, enzima indispensável para a mineralização óssea. [24,25]

Os osteócitos derivam dos osteoblastos e estão envolvidas por matriz celular, fixando-se e formando um espaço designado por cavidades ou lacunas. [26] Estas células são responsáveis pela síntese e manutenção da matriz do osso. Os osteócitos respondem às forças mecânicas aplicados ao osso, bem como efetuam trocas metabólicas e ajudam a manter a homeostase do cálcio no sangue. De referir que a morte dos osteócitos resulta em reabsorção da matriz óssea. [17,20,24]

Por sua vez, as células de revestimento ósseo são células achatadas, que se situam nas superfícies ósseas, tendo um papel essencial na diferenciação de células mesenquimais e na regulação da homeostasia mineral. Estas células resultam de osteoblastos que não ficaram aprisionados nas lacunas e não se diferenciaram em osteócitos. [5,24]

Os osteoclastos são células móveis, de grande dimensão e multinucleadas (2 a 10 núcleos). A superfície óssea onde se situam estas células, devido à erosão, geralmente apresentam uma depressão, conhecidas como lacunas de Howship. [17] Têm como principal função a reabsorção do tecido ósseo e participam na manutenção a longo prazo da homeostasia do cálcio sanguíneo. [5,24]

A MEO pode ser caracterizada como um material compósito natural que é constituído por aproximadamente 10% de água, 20% de proteínas (matéria orgânica) e 70% de fase mineral (matéria inorgânica). [5,19,23,27] A parte orgânica é composta por o osteoide, com fibras colágenas (colagénio do tipo I), proteoglicanos, glicosaminoglicanos (ácido hialurónico) e glicoproteínas de adesão. Com efeito, da parte inorgânica faz parte certos minerais como cálcio, fosfato, bicarbonato, citrato, magnésio, sódio e potássio. [17]

As fibras conjuntivas conferem resistência à tração, os proteoglicanos e os glicosaminoglicanos suportam a compressão e podem inibir a mineralização, e as glicoproteínas de adesão associam-se às células e aos componentes da MEO. [17] A fase mineral representa sensivelmente 50% do peso da MEO. Através de testes de difração de raios X, é possível verificar a existência de cristais compostos por cálcio e fósforo, onde tem a estrutura cristilina hexagonal da HAp, na seguinte composição:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e ainda a presença de fosfato de cálcio amorfo, na composição  $\text{CaPO}_3$ . [28,29] Existe ainda uma capa de hidratação na superfície do cristal, na qual facilita a troca de iões entre os cristais e o fluido intersticial. [17] Estes cristais de HAp tem cerca de 40 nm de comprimento, 5 a 20 nm de largura e 1.5 a 3 nm de espessura, sendo que estão localizados regularmente de 60 a 60 nm ao longo da fibra de colagénio. [19,23,28]

### **2.1.3 Propriedades mecânicas do Tecido Ósseo**

É importante caracterizar o osso do ponto de vista mecânico uma vez que o esqueleto funciona como sistema de cargas e está sendo constantemente submetido a um complexo de forças causadoras de deformações, ou seja, está sujeito a várias condições de carregamento mecânico. [30,31] O comportamento de resposta do tecido ósseo, quando sujeito à ação de forças externas, varia de acordo com determinados fatores, tais como a idade e género do paciente, a localização da carga, o tipo (compressão, tração ou corte), a direção (longitudinal, transversal ou oblíqua), bem como a velocidade da aplicação e a tensão mecânica sobreposta. [32]

As propriedades mecânicas de um osso variam de acordo com o seu nível de mineralização, porosidade, nível organizacional da MEO, tipo de osso e localização. Assim sendo, tem de se estudar as propriedades mecânicas do osso compacto e do osso trabecular separadamente. [13,27,33]

A porosidade do osso compacto varia entre 5 e 10% e apresenta uma densidade de 1.80-2.00 g/cm<sup>3</sup>, enquanto que a porosidade do osso trabecular varia entre 50 e 90% e uma trabécula individual retirada do osso esponjoso apresenta uma densidade média de 1.82 g/cm<sup>3</sup>. Este osso é constituído por uma rede irregular e interconectada de lâminas finas de osso com cerca de 50-300 µm de diâmetro. [13] De referir que cada trabécula individual possui a sua própria rigidez, que no conjunto das trabéculas formam uma estrutura que tem uma rigidez diferente. Portanto, o osso esponjoso tem uma rigidez do material que é a rigidez de cada trabécula, e ainda uma rigidez estrutural que é a rigidez da estrutura trabecular. Assim sendo, a maioria dos estudos biomecânicos do osso esponjoso concentra-se nas propriedades estruturais uma vez que as propriedades das trabéculas são difíceis de medir. [31] Os valores das propriedades mecânicas destes dois ossos encontram-se na Tabela 2.1. [13,34] Na Tabela 2.2, podem-se verificar diferentes densidades do osso cortical e do osso trabecular da região maxilar (alvéolo anterior (MX<sub>a</sub>), alvéolo posterior (MX<sub>b</sub>) e a maxila posterior (MX<sub>pp</sub>)), bem como os respetivos esforços de compressão e módulos de Young. É importante mencionar que, dependendo da região e da estrutura trabecular, o osso esponjoso apresenta várias densidades. [31,35,36]

Tabela 2.1 - Valores das propriedades mecânicas do osso. [13,34,35]

Propriedades	Osso Compacto	Osso Esponjoso
Resistência à compressão (MPa)	100 - 230	2 - 12
Resistência à tração (MPa)	50 - 150	10 - 20
Módulo de Young (GPa)	14 - 20	0.1 – 4.5

Tabela 2.2 - Densidades e respectivos módulos de Young do osso cortical e trabecular. [35,36]

Tipo de Osso	Densidade	Módulo de Young
Osso Cortical	1.64 g/cm <sup>3</sup>	16.7 GPa
Osso Trabecular (MX <sub>a</sub> )	0.64 g/cm <sup>3</sup>	759 MPa
Osso Trabecular (MX <sub>pp</sub> )	0.32 g/cm <sup>3</sup>	210 MPa
Osso Trabecular (MX <sub>p</sub> )	0.16 g/cm <sup>3</sup>	58 MPa

## 2.2 Biomateriais

Na primeira *Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*, realizada em 1991, um biomaterial era definido como um material não viável utilizado em dispositivos médicos, com finalidade de interagir com os sistemas biológicos, todavia atualmente um biomaterial é um “material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo”. [37,38]

Os biomateriais podem ser divididos em duas classes distintas: naturais (colagénio, amido, ácido hialurónico, etc.) e sintéticos. Estes também podem ser divididos de acordo com a sua interação com o meio envolvente, contudo este conceito foi evoluindo ao longo dos anos, como se pode ver na Figura 2.5. [5,39]

Um biomaterial tem de reunir as características específicas e apropriadas de modo a não desencadear qualquer reação tóxica ou imunogénica no local de implantação. [40] Estas características dispõem-se descritas na Tabela 2.3.

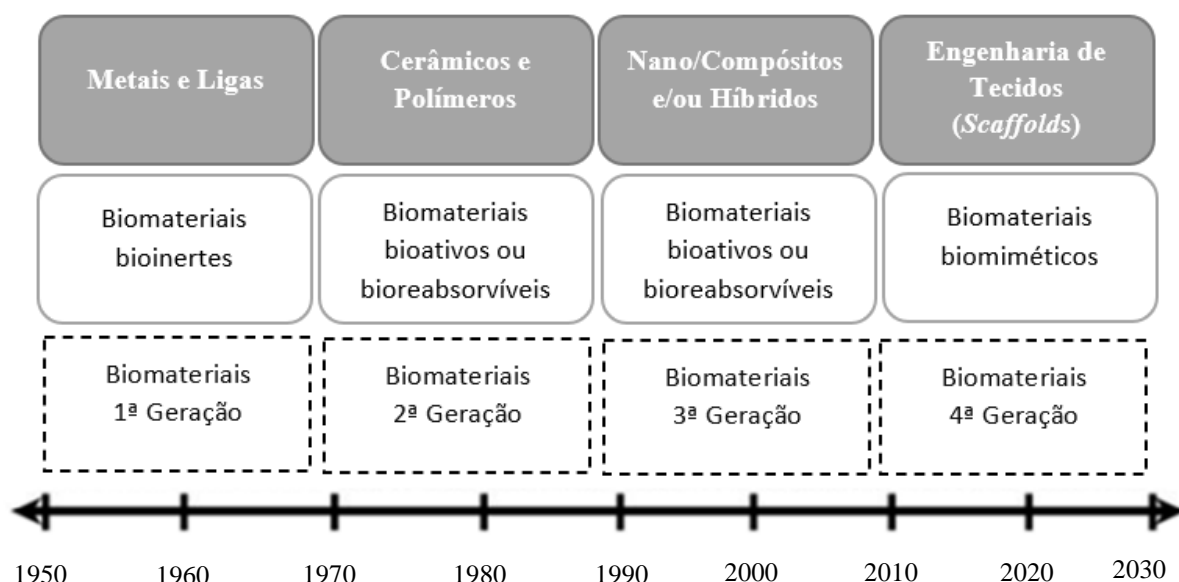


Figura 2.5 - Evolução dos biomateriais ao longo dos anos. Adaptado de [39]

Tabela 2.3 - Conjunto de características essenciais para a produção de um scaffold. [5,42]

Requisitos básicos	Descrição
Biocompatível	- Capacidade de um material desencadear no hospedeiro uma resposta apropriada, sem danos para o mesmo.
Biodegradável e/ou bioabsorvível	- O <i>scaffold</i> deve possuir uma taxa de degradação e de reabsorção comparáveis às do tecido ósseo.
Bioativo	- Capacidade de induzir deposição de fosfatos de cálcio à sua superfície.
Tamanho dos poros adequados	- Poros muito pequenos podem limitar a vascularização e poros muito grandes podem resultar num crescimento anômalo de tecido, bem como produzir <i>scaffolds</i> com propriedades mecânicas inadequadas.
Propriedades mecânicas	- O <i>scaffold</i> deve possuir uma resistência mecânica similar à do tecido nativo.

### 2.2.1 Cerâmicos

Os materiais cerâmicos têm como principais características serem sólidos não-metálicos, inorgânicos e são preparados por tratamento térmico seguido de arrefecimento. Apresentam inúmeras vantagens, tais como serem muito estáveis, bons isolantes térmicos e elétricos, e ainda resistentes ao desgaste. Contudo, tem como

principais desvantagens a ausência de ductilidade e uma baixa resistência à fratura. Costumam ser utilizados em aplicações médicas como substitutos ósseos em aplicações ortopédicas e maxilofaciais. [41,42] Dos biocerâmicos mais utilizados destacam-se a zircônia ( $ZrO_2$ ), a alumina ( $Al_2O_3$ ) e os fosfatos de cálcio (CaP). [42]

### 2.2.2 Polímeros biodegradáveis

Os polímeros biodegradáveis utilizados na engenharia de tecidos podem ser de duas classes distintas: naturais (de origem animal ou vegetal) e sintéticos. Os naturais apresentam baixa reação imunológica e boa capacidade de interação, todavia possuem uma reduzida resistência mecânica e degradam-se facilmente. No caso dos sintéticos podem-se controlar as suas propriedades mecânicas e taxa de degradação. Sua versatilidade química e processamento varia de acordo com sua estrutura e natureza. Na Tabela 2.4, é possível verificar alguns exemplos de polímeros. [19]

*Tabela 2.4 - Alguns polímeros utilizados em scaffolds, bem como algumas das suas propriedades. [19]*

Material	Origem	Propriedades
Colagénio	Natural	- Bom substrato para adesão celular; - Quimiotático.
Quitosano	Natural	- Promove a osteocondução, migração celular e vascularização; - Hemostático.
Amido	Natural	- Termoplástico; - Bom substrato para adesão celular.
Ácido hialurónico	Natural	- Quimiotático quando combinado com os agentes apropriados. - Baixa resposta imunológica.
Polihidroxiácidos	Sintética	- Poliésteres alifáticos; - Degradados por hidrólise.
Policaprolactona	Sintética	- Poliésteres alifáticos; - Degradados por hidrólise.
Polifosfazenos	Sintética	- Degradados por hidrólise.
Polianidridos	Sintética	- Utilizados em sistemas de entrega controlada de fármacos. - Permitem a regeneração do osso compacto e esponjoso.
Fumarato de polipropileno	Sintética	- Poliésteres insaturados; - Degradação por ácido fumárico e propileno glicol.

## 2.3 Hidroxiapatite

O material biocerâmico utilizado, neste trabalho, é a hidroxiapatite sintética. Com efeito, este biomaterial pertence à família dos fosfatos de cálcio e apresenta a capacidade de interagir quimicamente com o osso tanto *in vivo* como *in vitro*. [43,44] É também usada por apresentar características importantes como elevada bioatividade, biocompatibilidade, osteocondução e osteointegração. A HAp sintética é bastante semelhante à componente mineral do osso, promovendo baixa toxicidade e capacidade inflamatória. [34]

A HAp pertence ao grupo das apatites e tem quimicamente uma razão molar entre Ca/P de 1.67, valor idêntico às apatites do osso mineralizado. A sua composição molecular é representada por  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Possui uma estrutura cristalina hexagonal e apresenta como parâmetros de rede  $a=b=9.432\text{\AA}$  e  $c=6.881\text{\AA}$ . Esta estrutura consiste numa rede de dimensões nanométricas de iões hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ), localizados no centro de um triângulo de  $\text{Ca}^{2+}$ , ao longo do eixo c numa célula unitária hexagonal, como se pode verificar na Figura 2.6. [40] De referir que as possíveis relações entre Ca/P das apatites, os seus nomes e suas fórmulas estão expostas na Tabela 2.5. [45]

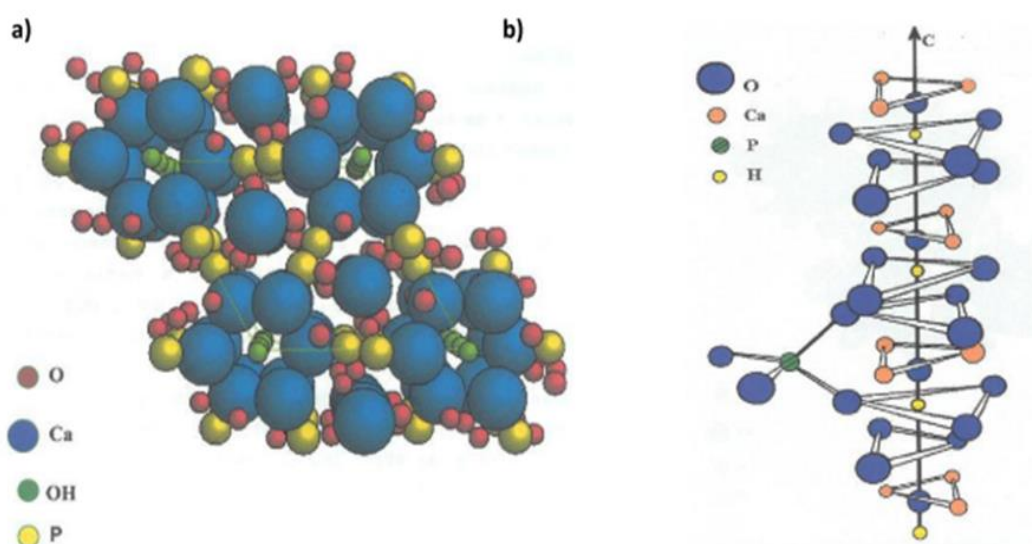


Figura 2.6 - a) Estrutura unitária da hidroxiapatite; b) Representação da estrutura da HAp ao longo do eixo c. [20]

A HAp biológica tem uma estequiometria variável, habitualmente com um défice de iões de  $\text{Ca}^{2+}$  e enriquecida com outros iões uma vez que ocorrem substituições iónicas ao longo do tempo. Assim, estas substituições alteram certas propriedades tais como a bioatividade, biocompatibilidade, solubilidade e velocidade de degradação da HAp. [46] Na Figura 2.7, pode-se encontrar a fórmula química da hidroxiapatite estequiométrica, bem como as possíveis substituições iónicas dos grupos hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ), fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). [47] As substituições iónicas na hidroxiapatite natural diminuem ao longo da vida e a sua estrutura vai-se aproximando da configuração estequiométrica, apresentando um aumento da sua cristalinidade. Com efeito, com o decorrer dos anos, este aumento leva a diferenças na velocidade de



remodelação do tecido ósseo que se resumem, de um modo geral, a uma diminuição da velocidade de biodegradação/reabsorção, no qual resulta numa diminuição da remodelação óssea.

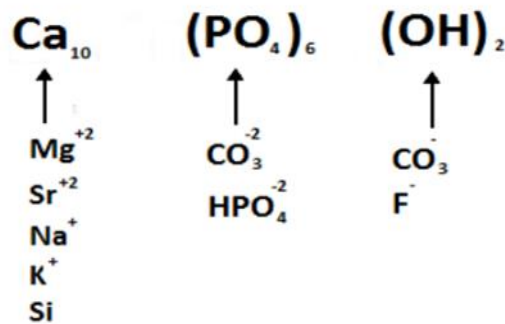


Figura 2.7 - Substituições iônicas possíveis da HAp biológica. [26]

Tabela 2.5 - Tipos, formula química e relação entre Ca/P das apatites. [44]

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Ca/P
Fosfato tetracálcico (TeCP)	Ca <sub>4</sub> O(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2.0
Hidroxiapatite (HAp)	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub>	1.67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> .nH <sub>2</sub> O	1.5
Fosfato tricálcico (α, α', β, γ) (TCP)	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.5
Fosfato octacálcico (OCP)	Ca <sub>8</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> .5H <sub>2</sub> O	1.33
Mono-hidrogénio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.0
Mono-hidrogénio fosfato de cálcio (DCP)	CaHPO <sub>4</sub>	1.0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	1.0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.0
Fosfato heptacálcico (HCP)	Ca <sub>7</sub> (P <sub>5</sub> O <sub>16</sub> ) <sub>2</sub>	0.7
Di-hidrogénio fosfato tetracálcico (TDHP)	Ca <sub>4</sub> H <sub>2</sub> P <sub>6</sub> O <sub>20</sub>	0.67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0.5
Metafosfato de cálcio (α, β, γ) (CMP)	Ca(PO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.5

## 2.4 Policaprolactona

A PCL é um polímero pertencente à família dos poliésteres alifáticos e lineares com carácter semicristalino, sendo que sua síntese ocorre a partir da abertura do anel da  $\epsilon$ -caprolactona, como se pode observar na Figura 2.8 que demonstra a reação de polimerização do PCL. [48,49,50]

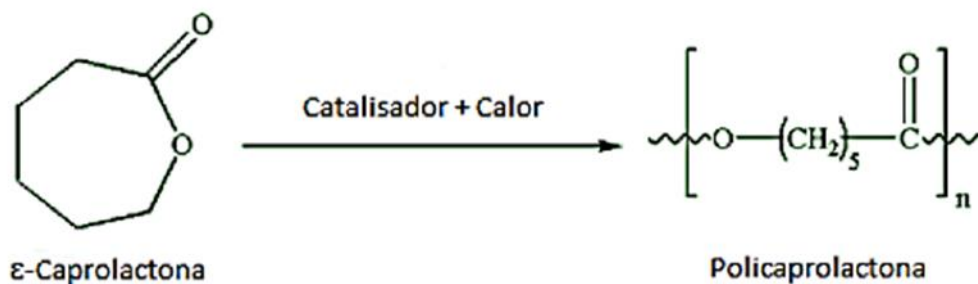


Figura 2.8 - Reação de polimerização do PCL. Adaptado de [50]

A policaprolactona é um polímero hidrofóbico, possui baixa toxicidade, baixa viscosidade e densidade no valor de  $1.13 \text{ g/cm}^3$ . Além disso, apresenta temperatura de transição vítrea abaixo da temperatura ambiente ( $-60^\circ\text{C}$ ) e uma baixa temperatura de fusão, entre os  $55$ - $60^\circ\text{C}$ . A sua massa molar pode variar de  $5.000$  a  $90.000 \text{ kg/mol}$ . [50,51]

Quanto às propriedades mecânicas, dependendo da massa molecular do polímero, a PCL possui um módulo de elasticidade de  $200$ - $440 \text{ MPa}$ , resistência à tração de  $20$ - $42 \text{ MPa}$  e resistência à compressão de  $120 \text{ MPa}$ , sendo um material interessante para a construção de *scaffolds* para regeneração de tecido ósseo. [5,52]

Devido à sua grande miscibilidade ou compatibilidade mecânica com outros tipos de polímeros, é capaz de formar misturas poliméricas com diversos polímeros, para além de ser solúvel em variados solventes orgânicos. Este polímero apresenta ainda cadeias muito extensas de carbono, possuindo uma enorme elasticidade. [51] A Figura 2.9 representa parte da cadeia principal do PCL.

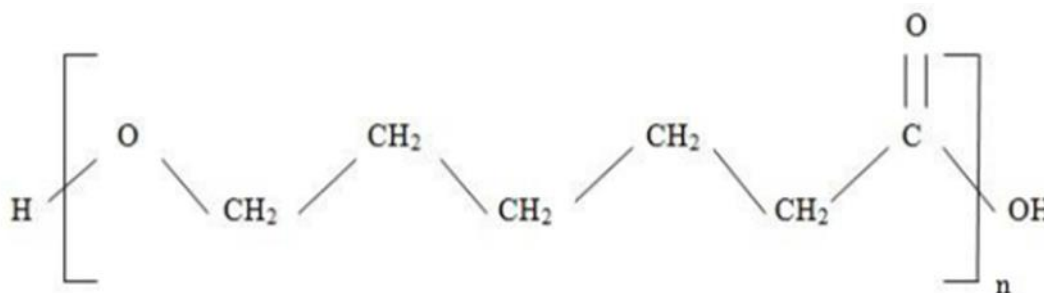


Figura 2.9 - Cadeia principal da policaprolactona. Adaptado de [54]

Desde a década de 1970, a PCL é um material autorizado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para aplicações médicas nos Estados Unidos da América. [54] A PCL exibe um tempo de degradação mais longo, entre 2 e 3 anos, devido à sua cristalinidade e hidrofobicidade, sendo por isso indicada para implantes de longa duração. Este polímero é degradado por microrganismos presentes no meio ou por hidrólise da sua ligação éster alifática em condições fisiológicas. [50,54] Com efeito, a degradação do PCL em ambientes em contato com o ar é mais rápida do que em ambientes onde não há oxigenação. [56]

## 2.5 Comportamento auxético

### 2.5.1 Introdução

Neste estudo, é relevante falar em estruturas com comportamento auxético. Estes materiais diferenciam-se dos convencionais, uma vez que apresentam como característica principal o Coeficiente de Poisson Negativo (CPN). O pioneiro deste conceito foi Lakes que publicou, em 1987, uma das primeiras publicações mais conhecidas relativamente a este tópico. [57] Em 1991, Evans introduziu o termo auxético, bem como as consequências para este comportamento e aplicações futuras. [58] Este tipo de material de nome “*auxetics*”, denominado por Evans, exibem características diferentes dos materiais ditos convencionais, não sendo um material recente, pois apareceram há mais de 100 anos, sendo consequência da teoria clássica da elasticidade. [59] A título de curiosidade, a palavra “auxético” deriva do grego (“*afxetos*”) que significa “aquele que pode ser aumentado”. O termo “*anti-rubber*” (anti-borracha) e “*dilatational materials*” foram ambos igualmente utilizados por Gleick e por Milton, respetivamente. [59,60]

A unicidade dos materiais auxéticos define-se pela expansão transversal, quando tracionados longitudinalmente, ao contrário dos materiais convencionais, como por exemplo a borracha, o vidro e os metais, que quando alongados, sofrem uma diminuição na sua dimensão transversal. A Figura 2.10 ilustra o comportamento descrito. Portanto, numa visão simplista, os materiais auxéticos quando tracionados expandem-se transversalmente, e quando comprimidos, contraem-se transversalmente. [62]

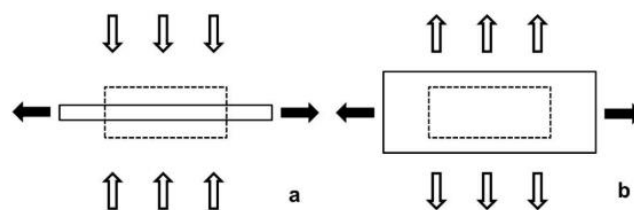


Figura 2.10 - Comparação do comportamento à deformação de materiais: (a) Material convencional; (b) Material auxético. Adaptado de [62]

### 2.5.2 Coeficiente de Poisson

O coeficiente de Poisson ( $\nu$ ) de um material é uma das constantes utilizadas para descrever as suas propriedades mecânicas fundamentais. Outras características são o módulo de Young (E), módulo volumétrico (K) e o módulo de Rigidez (G), no qual são expressos em unidade pascal, de acordo com o sistema internacional. [63]

No caso de os materiais serem isotrópicos, isto é, que possuem as mesmas características físicas em todas as direções, existem relações de dependência para as quatro constantes indicadas acima. Assim sendo, o módulo de rigidez, o módulo de Young e o coeficiente de Poisson estão relacionados pela equação 2.2 e o módulo de Young, o módulo volumétrico e o coeficiente de Poisson pela equação 2.3. [65]

$$E = 2G(1 + \nu) \quad 2.2$$

$$E = 3K(1 - 2\nu) \quad 2.3$$

Assim, uma das propriedades mecânicas fundamentais de um material homogêneo e isotrópico é definida pela razão entre a extensão transversal e a verificada segundo a direção de aplicação da carga (deformação longitudinal). Esta relação estabelecida é conhecida como coeficiente de Poisson,  $\nu$ , e é definida pela equação 2.1, onde  $\varepsilon_x$  e  $\varepsilon_y$  representam as extensões transversais e  $\varepsilon_z$  a extensão longitudinal. Deve-se referir que  $\varepsilon_x$ ,  $\varepsilon_y$  e  $\varepsilon_z$  são medidas adimensionais, logo  $\nu$  é adimensional. [63]

$$\nu = -\frac{\varepsilon_x}{\varepsilon_z} = -\frac{\varepsilon_y}{\varepsilon_z} \quad 2.1$$

A maioria dos materiais possui um valor de coeficiente de Poisson positivo, todavia este valor pode tomar valores contidos no intervalo entre -1 e 0.5. [64] Na Tabela 2.6 estão representados valores para alguns materiais comuns. [65]

*Tabela 2.6 - Coeficiente de Poisson de alguns materiais comuns. [65]*

Material	Coeficiente de Poisson
Aço	0.30
Alumínio	0.33
Cobre	0.34
Cloreto de polivinila (PVC)	0.38
Polycarbonato (PC)	0.36
Naylon	0.39
Borrachas	0.48-0.50
Óxido de alumínio	0.22
Cortiça	0.00

### 2.5.2 Estruturas Auxéticas

Segundo, estudos realizados pela NASA e pela Boeing, quando sujeitos a forças tangenciais, materiais com CPN demonstram melhorias em certas propriedades mecânicas, como a resistência ao corte, dureza, resistência à fadiga e ainda na tenacidade à fratura. [64] Além destas características, espumas com CPN exibem propriedades acústicas e de absorção superiores, quando comparadas com espumas convencionais. [66]

Na Figura 2.11, podem-se encontrar vários exemplos de estruturas reentrantes com comportamento auxético. [33]

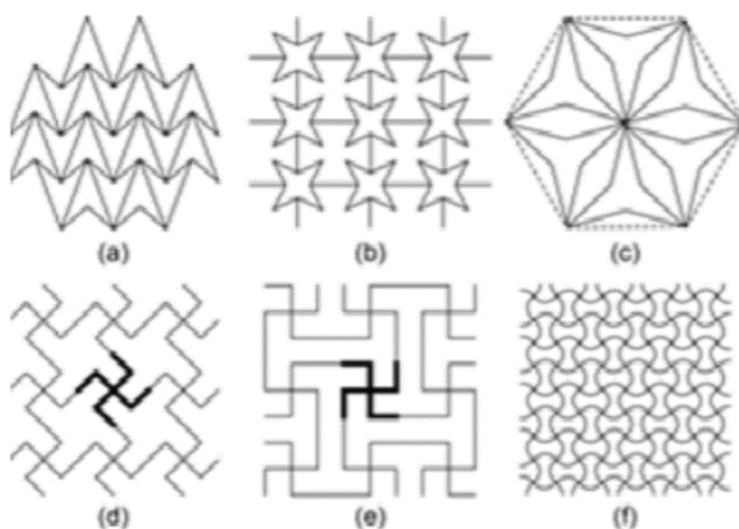


Figura 2.11 - Exemplos de estruturas reentrantes: a) Estrutura de seta de ponta dupla; b) favo de mel estrelar; c) favo de mel hexagonal estruturalmente reentrante; d) rede de losangos; e) grades quadradas; f) liga-ligamentos sinusoidais. [33]

As estruturas em cima referidas são exemplos de células reentrantes a 2 dimensões (2D), todavia, além deste tipo de células, também estruturas a 3D podem apresentar o efeito auxético. Na Figura 2.12 está a representação de dois exemplos: estrutura convencional contruída a partir de formas regulares (quadrados e hexágonos) e estrutura reentrante onde as nervuras se projetam para o interior da mesma. [66]

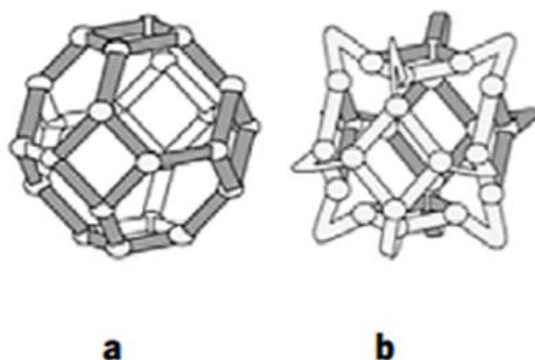


Figura 2.12 - Células tridimensionais: a) convencional; b) reentrante. [33]

Nos anos de 1880, o matemático alemão Hermann Schwarz (1843-1921) idealizou estruturas matematicamente complexas e com potencial para serem extremamente versáteis. Estas estruturas são chamadas de *Schwarzitas* em sua homenagem. Com efeito, devido ao mecanismo único de deformação em camadas que surge durante a carga, estas estruturas mostram resultados muito promissores como materiais de alto suporte de carga e ainda resistentes ao impacto. Assim, *Schwarzitas* são sólidos porosos com superfícies com um período mínimo, possuindo curvaturas gaussianas negativas, e suscetíveis de apresentarem propriedades mecânicas e eletrônicas pouco comuns. As técnicas de PR podem ser combinadas com a modelagem computacional para gerar estruturas de várias formas geométricas, como estas em questão, de maneira a abrir novas perspectivas à construção de materiais inovadores com propriedades ajustáveis. Na Figura 2.13 podem-se ver 2 representações do tipo *Schwarzitas*. [67]

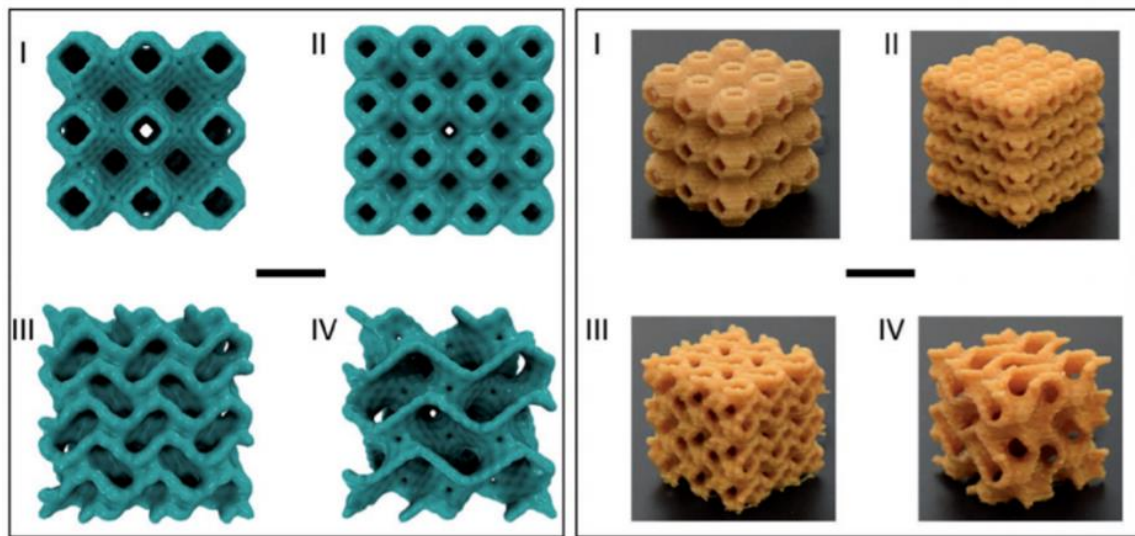


Figura 2.13 - Estruturas de Schwarzita: (I, II) Primitiva; (III, IV) Giróide. [67]

Em especial ênfase à estrutura em forma giróide, uma vez que esta é utilizada na criação dos *scaffolds* produzidos no âmbito deste trabalho. Um giróide é uma superfície mínima triplamente periódica (SMTP) infinitamente conectada, que foi descoberta por Alan Schoen em 1970. Superfícies mínimas de nível triplicado periódico, tais como diamante de Schwarz e primitiva de Schwarz, representam a solução para escalar funções avaliadas de três variáveis independentes. [67] Mencionar que estas SMTP, para além de serem simétricas, apresentam comportamento auxético. [68] Assim, as três variáveis independentes podem ser consideradas como as coordenadas  $x$ ,  $y$  e  $z$  de um ponto no espaço euclidiano tridimensional. A equação da superfície do nível de giróide é composta de funções trigonométricas  $F:R^3 \rightarrow R$  no ponto  $(x, y, z) \in R^3$ , e uma aproximação próxima ao giróide é definida segundo a equação:

$$F(x, y, z)_{Giroide} = \sin\left(2\pi \frac{x}{L}\right) \times \cos\left(2\pi \frac{y}{L}\right) + \sin\left(2\pi \frac{y}{L}\right) \times \cos\left(2\pi \frac{z}{L}\right) + \sin\left(2\pi \frac{z}{L}\right) \times \cos\left(2\pi \frac{x}{L}\right) - T$$

onde  $L$  é o comprimento da borda da célula unitária cúbica, e o parâmetro de nível  $T$  é uma variável que determina as frações de volume pertencentes às regiões separadas pela superfície. [69] Quando se iguala  $T = 0$  e  $F(x, y, z)_{Giroide} = 0$ , obtém-se uma malha com a geometria igual à da Figura 2.14. [70]

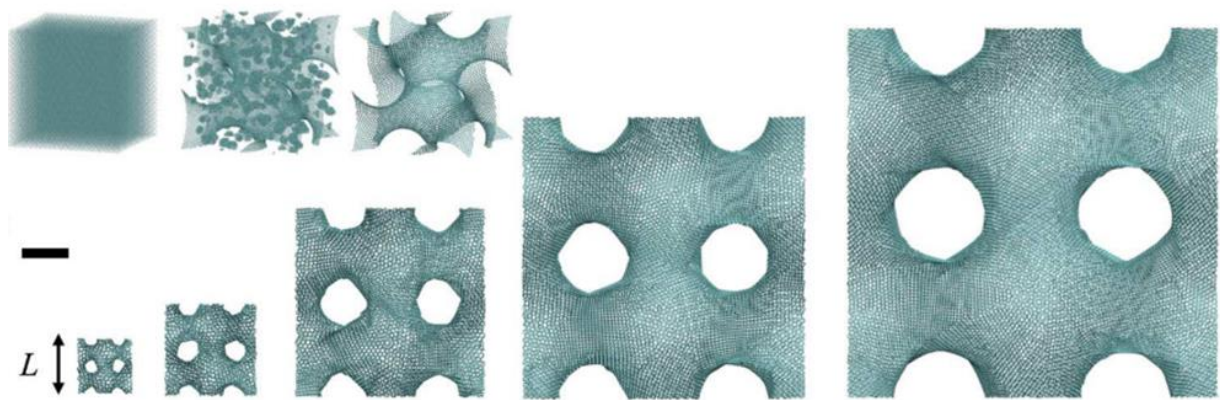


Figura 2.14 - Diferentes perspectivas e tamanhos  $L$  de uma estrutura Giróide. [70]

## 2.6 Ensaios mecânicos

Os ossos estão constantemente sujeitos a esforços de tração, compressão, flexão e torção, sendo que diversas vezes podem suportar uma combinação desses múltiplos esforços. Assim sendo, a área da biomecânica é a aplicação da mecânica aos tecidos biológicos, avaliando as respostas dos mesmos às múltiplas solicitações de natureza mecânica. [71]

Os ensaios mecânicos podem ser classificados em duas classes: destrutivos, quando promovem a rutura ou a inutilização do material, e não destrutivos. [72] Na primeira classe são exemplos os ensaios de tração, impacto, dobragem, flexão, fadiga, compressão e outros. Dos ensaios não destrutivos são destacados os de difração de raios X, ultrassom e radiografia que podem ser adaptados para analisar a resposta mecânica de um material. [72]

Neste trabalho, vão ser realizados ensaios de compressão uniaxial. Estes permitem verificar a aptidão do material para suportar deformações plásticas sem atingir o colapso. [73] A partir deste teste é possível determinar a curva Tensão x Deformação e avaliar propriedades como a elasticidade linear, a cedência plástica, a tensão de colapso e a zona de densificação. De referir que estes parâmetros são importantes para o âmbito deste trabalho.

A conversão dos valores de força ( $F$ ) em tensão nominal ( $s$ ) é realizada através da equação 2.4, onde  $F$  é a força exercida uniformemente na estrutura e  $A_0$  é a área inicial da secção reta da peça. A extensão convencional ( $e$ ) é calculada através da equação 2.5, onde  $\Delta H$  é o deslocamento realizado pelo travessão da máquina de tração (variação de altura) e  $H_0$  é a altura inicial da peça. Na presença de uma estrutura porosa, calcula-se a área equivalente, através da equação 2.6, onde  $\emptyset$  corresponde à fração de porosidade e  $A$  corresponde à área projetada do objeto.

$$s = \frac{F}{A_0} \quad 2.4$$

$$e = \frac{\Delta H}{H_0} \quad 2.5$$

$$A_{equivalente} = A(1 - \emptyset) \quad 2.6$$

A curva de engenharia não fornece uma indicação real das características de deformação do material, uma vez que se baseia nas dimensões iniciais do corpo e estas variam continuamente durante o ensaio. Assim sendo, a tensão média baseada na secção inicial do corpo não traduz com rigor o estado de tensão instalado na secção do corpo sendo, no caso de ensaios de compressão, maiores às tensões reais baseadas na secção instantânea. [74] Assim sendo, a curva tensão real - extensão real relaciona a variação de área da secção transversal com a variação do comprimento linear do objeto. Com efeito, a tensão real é dada pela equação 2.7 e a deformação real pela equação 2.8.

$$\sigma_{real} = s(1 + e) \quad 2.7$$

$$\varepsilon_{real} = \ln(1 + e) \quad 2.8$$

Na análise da curva Tensão - Extensão, presente na Figura 2.15, conseguem-se distinguir duas zonas: a zona elástica (região onde o corpo retorna ao seu estado inicial após parar a força aplicada, pelo que é uma deformação transitória) e a zona elasto-plástica (região onde o corpo não retorna ao seu estado inicial, pelo que, concomitantemente à deformação elástica, ocorre uma deformação permanente, designada deformação plástica).

Uma característica importante a determinar na região elástica é o módulo de elasticidade, mais conhecido por módulo de Young. Através da realização do Método *Offset* de 0.2%, determina-se não só este valor como se obtém também o limite de elasticidade. [75]

A tensão de colapso, também designada por tensão de *plateau* ou tensão de patamar, é um parâmetro importante na caracterização de determinados materiais, como espumas. A tensão de *plateau* depende da tensão limite de elasticidade do material base e da densidade do material. [75] Este parâmetro já se encontra na região elasto-plástica.

Na região de densificação, o sólido apresenta-se cada vez mais compacto, e no limite, pode ser considerado unicamente como um sólido compacto, e permitindo o declive,  $\frac{d\sigma}{d\varepsilon}$ , nesta região determinar o valor do módulo de Young do material denso. [76]



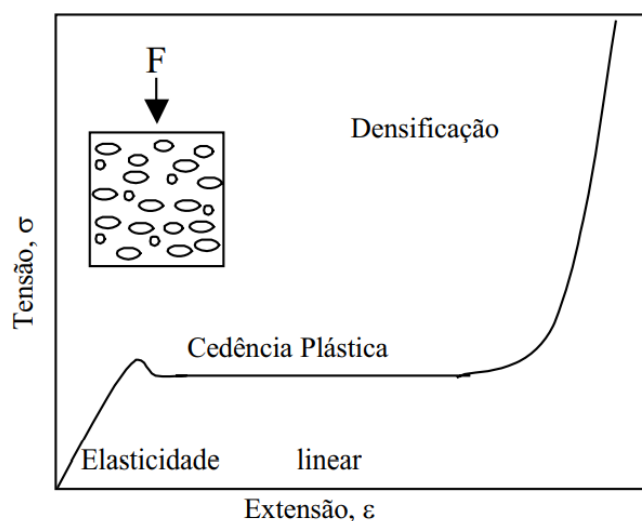


Figura 2.15 - Curva típica de uma espuma à compressão. [75]

Através destas curvas, torna-se possível calcular a capacidade de absorção de energia por parte do material. A energia absorvida por unidade de volume,  $E_v$ , num determinado intervalo de extensão, corresponde à área por baixo da curva e pode ser calculada pela seguinte equação 2.9. A eficiência de absorção de energia,  $\eta$ , visualizada na equação 2.10, traduz a relação entre a energia absorvida pelo material real e a energia absorvida por um absorvedor ideal. [75] O absorvedor ideal apresenta uma curva de compressão retangular e mantém-se constante durante todo o processo de deformação até a zona de densificação, como pode-se ver na Figura 2.16.

$$E_v = \int_{\varepsilon_1}^{\varepsilon_2} \sigma(\varepsilon) d\varepsilon \quad 2.9$$

$$\eta = \frac{E_v}{\sigma_o(\varepsilon_2 - \varepsilon_1)} \quad 2.10$$

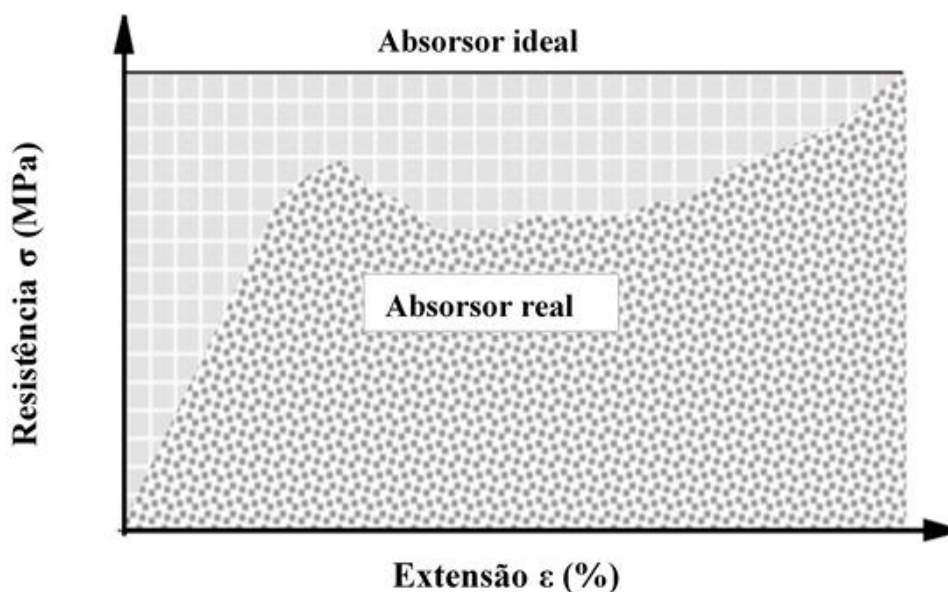


Figura 2.16 - Comparação entre absorvedor de energia: real e ideal. [75]

O comprimento da área do patamar de colapso, durante um ensaio de compressão, é influenciado por diversas propriedades como a densidade relativa, a morfologia celular, a anisotropia e gradientes de densidade. Na Figura 2.17, está exemplificado o comportamento da deformação, nomeadamente a espumas, com diferentes densidades quando submetidas à compressão. [75]

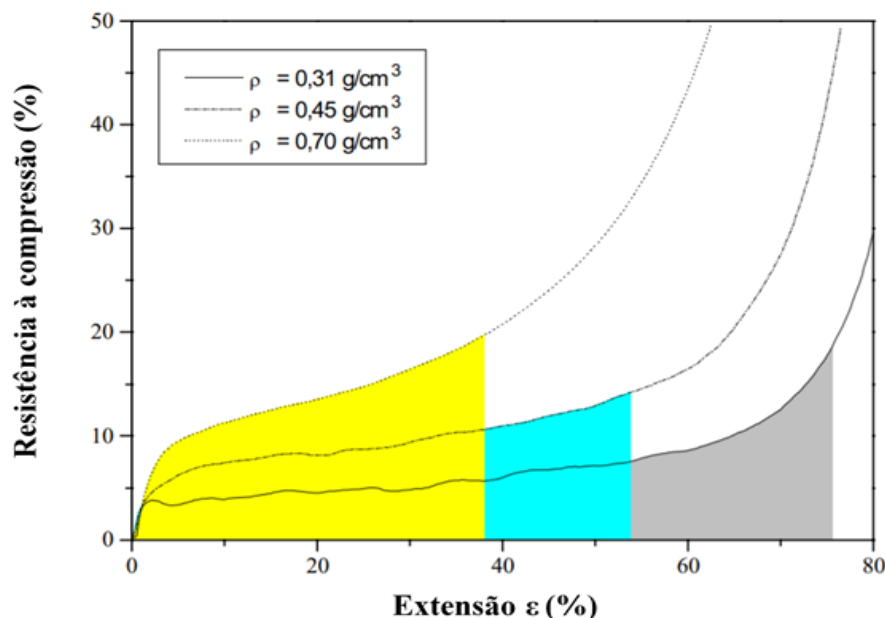


Figura 2.17 - Curvas de compressão de espumas com diferentes densidades. [76]

## 2.7 Técnicas de fabrico de *scaffolds*

Parâmetros como a geometria e a porosidade são requisitos essenciais para o crescimento e distribuição de células por toda a estrutura 3D, promovendo assim a vascularização e a regeneração do tecido ósseo danificado. Uma estrutura com uma rede de poros interconectados e a existência de uma porosidade entre 40-60% permitem uma rápida difusão de nutrientes, bem como ajuda na distribuição uniforme das células pelo *scaffold*, assegurando assim a sobrevivência, migração e proliferação *in vivo* das células. Portanto, a arquitetura do *scaffold* influencia não só as propriedades mecânicas como também determina a resposta biológica do organismo. [77] Assim sendo, a fabricação aditiva, mais conhecida em inglês por *additive manufacturing*, permite a construção de um material de acordo com um modelo virtual 3D previamente automatizado. Esta técnica é realizada camada a camada e permite a fabricação de geometrias mais complexas. [78] No ano 1987, foi a primeira vez que surgiu esta técnica com estereolitografia da *3D Systems*, no qual caracteriza-se por ser um processo que solidifica finas camadas de polímero líquido sensível a raios ultravioleta utilizando um laser. Esta técnica é considerada a pioneira no que diz respeito à PR. [78] Desde então, esta técnica tem sido cada vez mais estudada e introduzida em inúmeras empresas de investigação. [78]

Atualmente, o fabrico de *scaffolds* pode ser realizado por dois métodos distintos: o convencional e o avançado. Os métodos convencionais incluem técnicas como, formação de espumas, liofilização, lixiviação, separação de fase e enformação de fibras. Contudo, estes métodos possuem limitações tais como, não

permitirem o controlo da arquitetura interna e apresentarem fraco controlo sobre a porosidade. [7,78] Além disto, possuem ainda certas desvantagens como o facto de a operação ser manual o que exige muito tempo e a sua produção em massa, apresentar fracas propriedades mecânicas o que torna difícil a sua aplicação em regiões do corpo sujeitas a cargas elevadas e a utilização de solventes tóxicos no qual pode afetar a biocompatibilidade do *scaffold*. [79] Em contrapartida, os métodos avançados, nomeadamente as técnicas de PR, assentam nas etapas básicas descritas na Figura 2.18 e possuem vantagens como, versatilidade e rapidez de processamento, controlo da arquitetura interna e consequente porosidade. [8,79,80] Assim pode-se considerar que o processo de PR se baseia nas seguintes etapas básicas: [82]

- Aquisição de imagens 3D, através de dados de tomografia axial computadorizada ou de ressonância magnética;
- Conversão das imagens adquiridas em modelos virtuais da estrutura a ser produzida, através de um *software* CAD (*computer aided design*);
- Transformação destes modelos CAD num conjunto de camadas secionadas sucessivamente, através de um *software* CAM (*computer assisted manufacturing*);
- Produção do objeto, através da fabricação aditiva, originando um *scaffold* adequado à reconstrução de tecidos ósseos danificados.

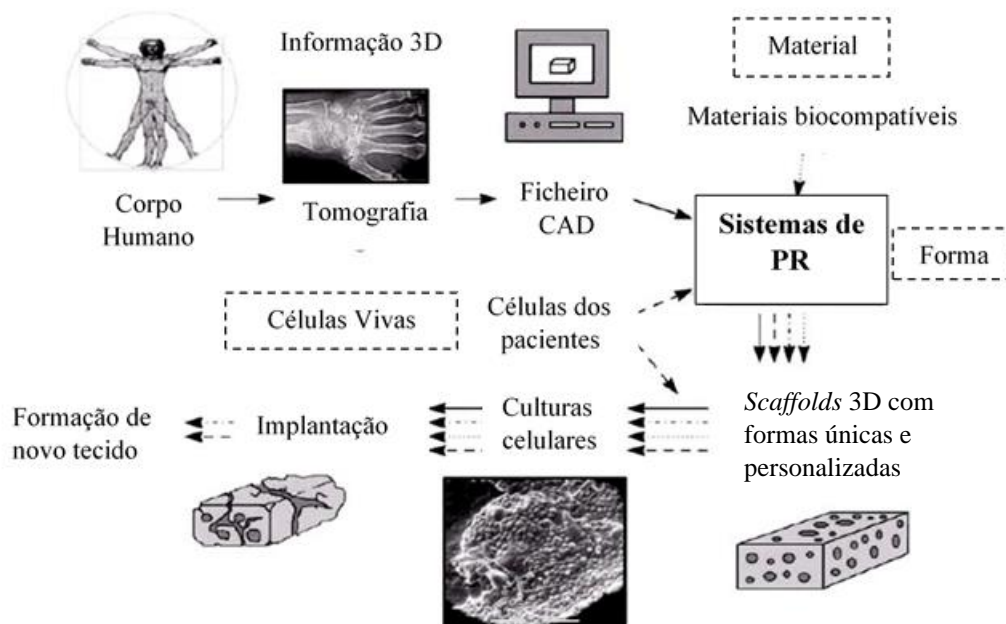


Figura 2.18 - Imagem ilustrativa do método de PR para aplicações biomédicas. Adaptado de [82]

Atualmente, o nome “Prototipagem rápida” está a ficar em desuso em detrimento da designação de “Processos de fabricação aditiva” ou “Biofabricação”, no caso de se tratar do fabrico rápido de biomateriais. [21] Com efeito, para a obtenção de modelos físicos, podem usadas técnicas subtrativas ou aditivas. No caso das técnicas subtrativas, tem-se o exemplo da maquinagem CNC, da fresagem ou do torneamento, que

recorrem a processos de fabrico que se baseiam na remoção sucessiva de camadas de material. Por outro lado, tal como o nome indica, as técnicas aditivas recorrem ao fabrico de modelos por adição sucessiva de camadas. Nestas técnicas estão associados processos de estereolitografia (SLA), sinterização seletiva por laser (SLS), impressão 3D (*3D printing*), impressão direta por extrusão (*3D plotting*) e ainda modelagem por deposição de material fundido (FDM). [8,79] Estas técnicas podem ser classificadas de acordo com o tipo de material, isto é, pela forma inicial que o material se encontra, ou seja em forma líquida, sólida ou em pó. [80]

### 2.7.1 Estereolitografia (SLA)

A tecnologia e o termo SLA foram criados em 1990, por Chuck Hull, fundador da empresa *3D Systems*. [7] A SLA é uma técnica que recorre a materiais fotossensíveis e apresenta resoluções na ordem dos 14-150  $\mu\text{m}$ . Este método consiste no fabrico de objetos por adição sucessiva de camadas baseada numa tecnologia a laser. O processo de SLA funciona a partir de um laser que, ao ser direcionado a uma cuba com resina líquida fotossensível, endurece a mesma criando a estrutura 3D pretendida. De referir que este direcionamento do laser se realiza camada a camada, solidificando a resina através de uma reação fotoquímica provocada por um feixe UV que fotopolimeriza a resina líquida. Após a construção da primeira camada, a cuba desce através de uma plataforma elevatória e a partir daí, cada vez que o laser passa, a resina exposta solidifica e liga-se à camada inferior. [8,79] Este processo acontece em meio líquido, pelo que são geradas, pelo *software* do equipamento, estruturas de suporte sólidos em resina. Após produção da peça, esta técnica requer algumas etapas de pós processamento, isto é, remover as estruturas de suporte e submeter as peças a um processo de cura para o aumento da resistência mecânica. Este sistema de impressão pode ser visualizado na Figura 2.19.

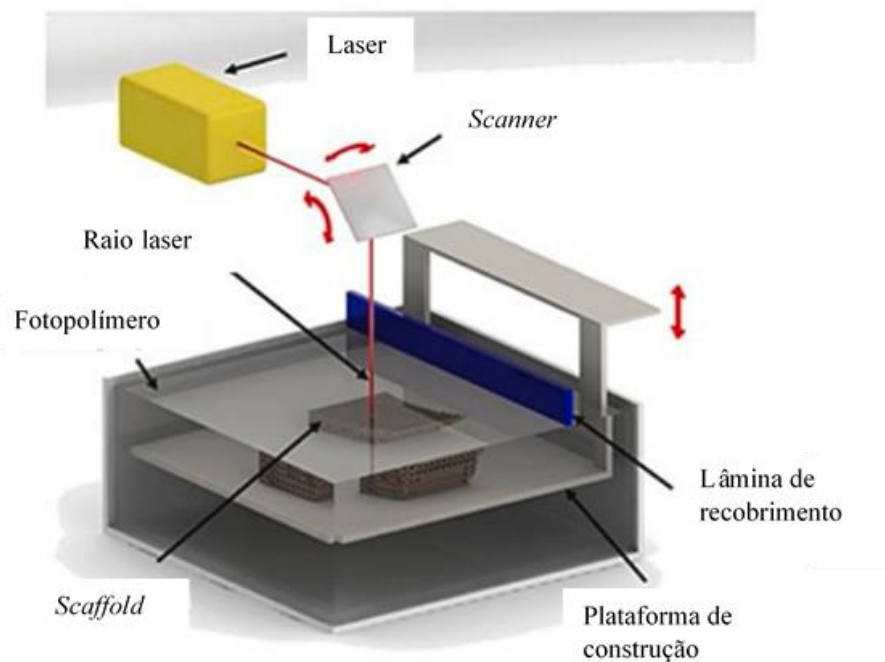


Figura 2.19 - Esquema representativo de um equipamento de estereolitografia.  
Adaptado de [83]

### 2.7.2 Sinterização seletiva por laser (SLS)

No ano 1989, a sinterização seletiva a laser (SLS) foi desenvolvida e patenteada por Carl R. Deckard, sendo comercializada desde 1992. A SLS é uma técnica de pós e apresenta resoluções na ordem dos 50-1000  $\mu\text{m}$ . Este método baseia-se na sinterização seletiva com base na utilização de pós (polímeros, compósitos, metais ou ligas metálicas), utilizando um feixe de laser de alta intensidade. [83] A produção da peça inicia-se com a colocação de uma fina camada de pó termofundível sobre uma superfície, através de um rolo de nivelamento. Em seguida, o sistema laser varre seletivamente a zona de construção de forma a produzir o objeto proveniente do ficheiro CAD. Por fim, a plataforma de construção desce, repetindo o processo novamente, produzindo a peça camada a camada. De referir que o pó não sinterizado, que envolve o meio construído, é removido e realizam-se operações de acabamento. Esta técnica é fabricação preferida para produção de matrizes cerâmicas porosas complexas, adequadas à implantação em tecidos ósseos danificados. [81] Este sistema de impressão está exposto na Figura 2.20.

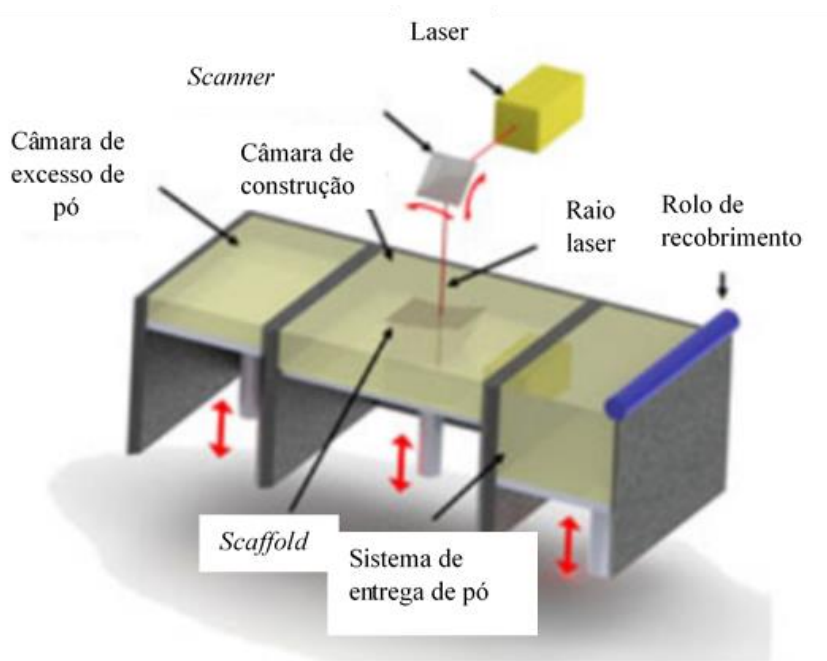


Figura 2.20 - Representação esquemática de um equipamento de sinterização seletiva a laser. Adaptado de [83]

### 2.7.3 Impressão 3D (3DP)

Impressão tridimensional (3DP), originalmente foi desenvolvida no *Massachusetts Institute of Technology* no início da década de 1990, sendo patenteada por Michal J. Cima em 1993. [27,82] A 3DP é uma técnica de pós e apresenta resoluções na ordem dos 50-300  $\mu\text{m}$ . Este método tem início na deposição controlada de uma camada uniforme de pó de material no topo da cuba de fabrico. Após efetuada a distribuição de pó, através de um rolo, é depositado seletivamente um ligante, provocando a ligação das partículas do pó entre si na zona de impressão pretendida. Em seguida, a plataforma elevatória da zona de construção desce, repetindo-

se sucessivamente, camada a camada, até a peça estar completa. Este ligante permite também a ligação entre as várias camadas construídas, conferindo às peças a resistência suficiente para serem manuseados. Para deposição do ligante é utilizada uma cabeça de impressão similar às cabeças convencionais das impressoras de jato de tinta. Imediatamente após impressão, a estrutura encontra-se envolvida em pó solto não ligado, de maneira que é necessário remover o excesso de pó através da aplicação de ar comprimido. Estes modelos devem ser sujeitos a um tratamento térmico, permitindo fortalecer a ligação entre as partículas e por consequência aumentar a resistência mecânica da peça. [8,78,80] Este sistema de impressão encontra-se representado na Figura 2.21.

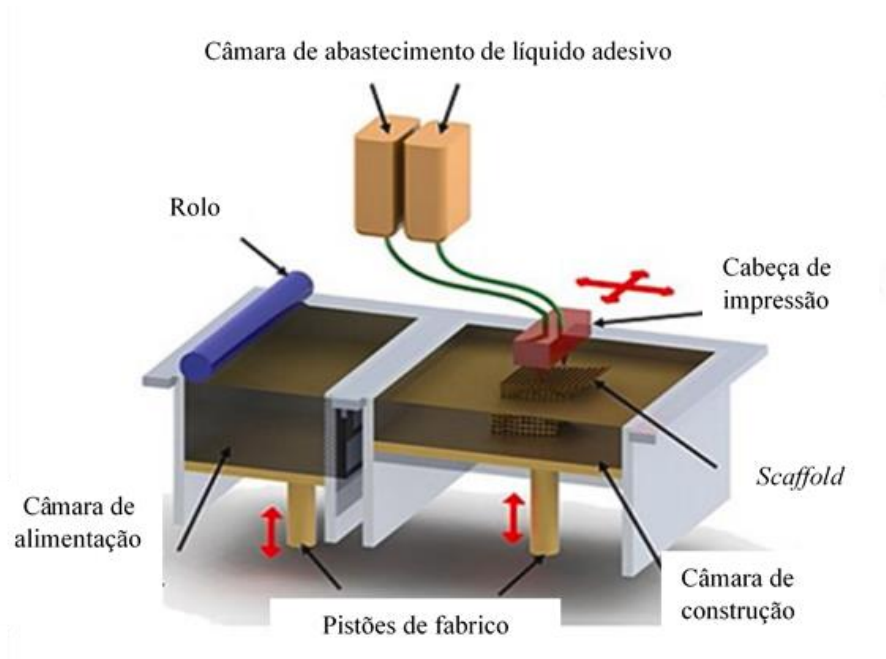


Figura 2.21 - Esquema de um equipamento de impressão 3D. Adaptado de [83]

#### 2.7.4 Impressão direta por extrusão (IDE)

A IDE é uma técnica de extrusão de suspensões/pastas e apresenta resoluções na ordem dos 225-750  $\mu\text{m}$ . A impressão 3D baseada em extrusão é um processo no qual a pasta é seletivamente dispensada por meio de uma agulha de extrusão que se move no plano XY. O equipamento é apoiado por uma plataforma elevatória que desce gradualmente (plano Z) para definir a altura da camada. Este procedimento permite uma fabricação camada por camada. [80] A principal característica desta técnica é a distribuição 3D de suspensões/pastas líquidas que podem ser compostas por polímeros, cerâmicos e/ou compósitos. Assim sendo, a solução produzida é colocada dentro de uma seringa e posteriormente extrudida através da agulha, seguindo o padrão existente no ficheiro CAD. A solidificação da peça acontece através da evaporação de um solvente volátil presente na solução. De referir que nenhuma estrutura de suporte é necessária. [80,82] Não é necessário o uso de altas temperaturas, evitando assim preocupações associadas com degradação de polímeros e agentes bioativos. Envolvem o uso de solventes orgânicos que, se não forem completamente removidos, podem



comprometer a biocompatibilidade dos *scaffolds*, bem como alterar a sua bioatividade. [83] Este sistema de impressão está exposto na Figura 2.22.

Nesta técnica de PR, o tipo de material, o diâmetro da seringa e a velocidade de deposição definem a resolução da peça. Com efeito, a tensão de corte aumenta com a diminuição do diâmetro da agulha, o que pode afetar a resolução da peça e, por consequente, a viabilidade celular. [84]

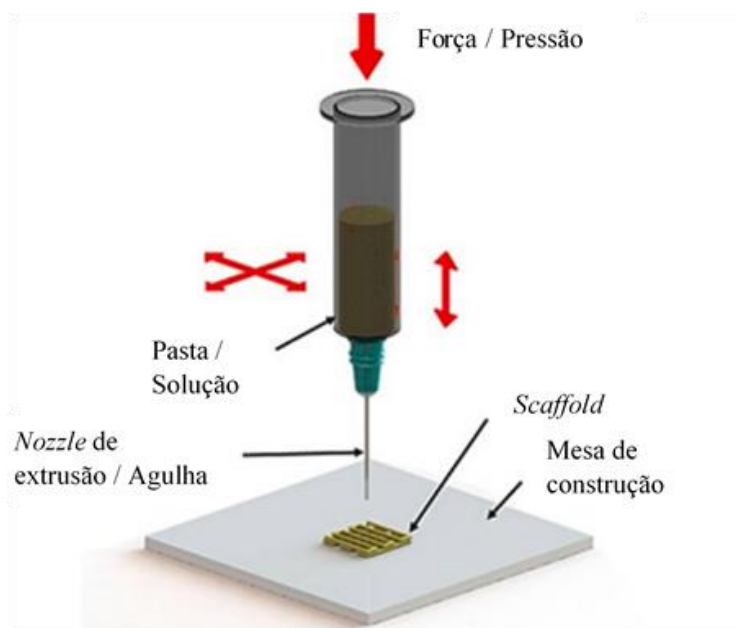


Figura 2.22 - Esquema representativo de um equipamento de impressão direta por extrusão. Adaptado de [83]

### 2.7.5 Modelagem por deposição de material fundido (FDM)

No presente trabalho, esta foi a técnica de fabricação aditiva utilizada para produzir os moldes para fabrico das estruturas giróide. A modelagem por deposição de material fundido (FDM) é um modelo de PR disponível, originalmente desenvolvido em 1992, com objetivo à rápida fabricação de protótipos para a indústria. [83] A FDM é uma técnica de extrusão de materiais fundidos e apresenta resoluções na ordem dos  $\mu\text{m}$  100-500. Este método baseia-se na extrusão de um filamento polimérico através de um *nozzle* aquecido, armazenado no interior de um rolo de abastecimento. Assim sendo, o material polimérico na forma filamentar é derretido e, em seguida, depositado numa superfície, formando camadas finas que dão forma às várias secções do modelo virtual desenhado. O sistema trabalha num ambiente com temperatura regulada, sendo que a mesa de construção é também aquecida para uma melhor fixação da estrutura. [81] Dois *nozzles* independentes, representados na Figura 2.23, podem ser utilizados na mesma impressão para depositar diferentes materiais poliméricos, um geralmente aplicado como material de suporte e outro para produzir o objeto 3D em questão. [83] Mencionar que para cada camada de material depositado, a direção da deposição do material, isto é, a disposição padrão, pode ser alterada. [79] A FDM não envolve a utilização de solventes

tóxicos, todavia como recorre a temperaturas elevadas, impede a incorporação de moléculas orgânicas com características biológicas. [7] Este sistema de impressão está descrito na Figura 2.23.

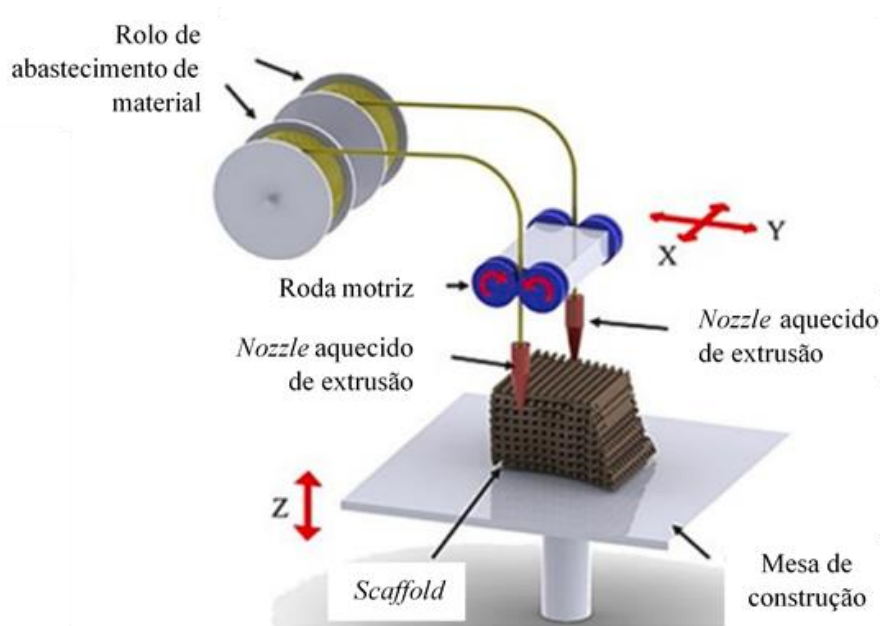


Figura 2.23 - Dispositivo de impressão de modelagem por deposição de material fundido. Adaptado de [83]

## 2.7.6 Comparação das várias técnicas de Prototipagem Rápida

As técnicas mencionadas anteriormente permitem a construção de objetos com formas e desenhos complexos quase ilimitados, para além da existência de uma grande variedade de materiais que podem ser escolhidos para impressão. [7] Na Tabela 2.7, podem-se analisar e comparar as técnicas de PR mais utilizadas em engenharia de tecidos, apresentando vantagens e desvantagens de cada método.

Tabela 2.7 - Fatores que diferenciam os processos de PR. [27,81,83]

Técnica	Vantagens	Desvantagens
SLS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Não necessita de estrutura de suporte;</li> <li>- Materiais porosos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevadas temperaturas de processamento;</li> <li>- Pó pode ficar aprisionado dentro da peça;</li> <li>- Materiais limitados e de alto custo;</li> <li>- Intensidade do laser pode induzir a degradação de polímero.</li> </ul>
3DP	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ampla gama de materiais;</li> <li>- Nenhuma estrutura de suporte é necessária;</li> <li>- Baixo custo;</li> <li>- Materiais porosos;</li> <li>- Alta taxa de produção.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pó pode ficar aprisionado dentro da peça;</li> <li>- Pulverização difícil graças à fraca ligação entre as partículas;</li> <li>- Microestrutura limitada pelo tamanho da partícula;</li> </ul>



		-Baixas propriedades mecânicas do <i>scaffold</i> sem pós-processamento.
SLA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibilidade de encapsulamento de células;</li> <li>- Elevada precisão.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Necessidade de fotopolímero;</li> <li>- Escassez de materiais biocompatíveis e biodegradáveis adequados;</li> <li>- Necessidade de estrutura de suporte;</li> <li>- Baixa resistência mecânica dos modelos iniciais;</li> <li>- Necessidade de pós-processamento.</li> </ul>
FDM	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sem utilização de solventes orgânicos;</li> <li>- Confere alta resistência mecânica;</li> <li>- Inexistência de materiais aprisionados na estrutura.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possível degradação térmica de polímeros;</li> <li>- Elevadas temperaturas de processamento;</li> <li>- Necessidade de polímeros termoplásticos;</li> <li>- Anisotropia mecânica.</li> </ul>
IDE	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta precisão na deposição de pastas poliméricas;</li> <li>- Microporosidade nos <i>scaffolds</i>;</li> <li>- Ampla variedade de materiais.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilização de solventes orgânicos;</li> <li>- Restrição na geometria;</li> <li>- Elevado tempo de construção.</li> </ul>

## Materiais e Métodos

### 3.1 Materiais

Para desenvolvimento deste trabalho, no que diz respeito à formulação das amostras, foram utilizados os seguintes materiais: pó cerâmico de hidroxiapatite sintética, policaprolactona e uma mistura formada de três solventes, nomeadamente diclorometano (DCM), 2-butoxietanol (2-Bu) e dibutilftalato (DBP).

A hidroxiapatite sintética utilizada foi fornecida pela Sigma-Aldrich. A PCL usado foi fornecida pela Sigma-Aldrich e possui uma massa molecular média em número de 80.000 g/mol. Todos os solventes usados foram fornecidos pela Sigma-Aldrich: o DCM é primordial na dissolução do PCL e na solidificação da pasta, 2-Bu funciona como surfactante e o DBP atribui propriedades elásticas às amostras.

No que diz respeito à realização dos moldes por impressão 3D, o material utilizado para a sua produção foi o poli(acetato de vinilo) (PVA). Este material caracteriza-se por ser um polímero sintético termoplástico, neutro e atóxico. Para além destas características, o PVA é solúvel em água não deixando resíduos nocivos tanto nas amostras como para o meio ambiente. [85] Este aspeto é muito importante já que neste trabalho os moldes de PVA foram usados para a produção de estruturas giróides, tal como se refere adiante. O filamento de PVA utilizado foi fornecido pelo fabricante *Ultimaker* e apresenta um ponto de fusão de 163 °C.

#### 3.1.1 Produção das Amostras

Primitivamente, foram produzidas várias formulações de pasta com vista a obter a melhor configuração entre a quantidade de pó cerâmico e de polímero. Assim, segundo o trabalho de *Adam E. Jakus et al.*, idealmente a melhor formulação seria a utilização de 90 wt% HAp e 10 wt% PCL, em que por cada 1 cm<sup>3</sup> de HAp era utilizado 0.6 gramas de 2-Bu. [94] A proporção entre os solventes DCM, 2-Bu e DBP era de 10:2:1, respetivamente. Depois do polímero estar totalmente dissolvido em DCM adiciona-se as quantidades de surfactante e de plastificante à solução. Em seguida, adiciona-se o pó cerâmico, faz-se uma pesagem inicial (com objetivo de calcular o DCM evaporado ao longo do tempo) e, por último, a pasta alcançada é agitada periodicamente num ambiente aberto com a ajuda de uma espátula. Este último passo é importante uma vez que aumenta a viscosidade da pasta através da evaporação do DCM até que fique com as condições apropriadas para injeção no molde da estrutura. Aquando a preparação total da pasta é importante ou utilizá-la de imediato ou então adicionar 1-2 mL de DCM, evitando assim a sua solidificação, e armazená-la num recipiente bem tapado dentro do frigorífico, de modo a não existir evaporação devido à alta volatilidade do DCM.

Para além desta formulação, realizou-se outra pasta com a mesma quantidade de sólidos (90/10 wt%), mas com o seguinte rácio 10:4:2, de acordo com a ordem de solventes descrita acima. Por último, realizou-se mais duas formulações, mas com as seguintes proporções, entre o pó cerâmico e o ligante polimérico, 80/20 wt% e 70/30 wt% respetivamente. De referir ainda que o procedimento é igual ao descrito previamente e que o rácio utilizado se manteve 10:4:2.

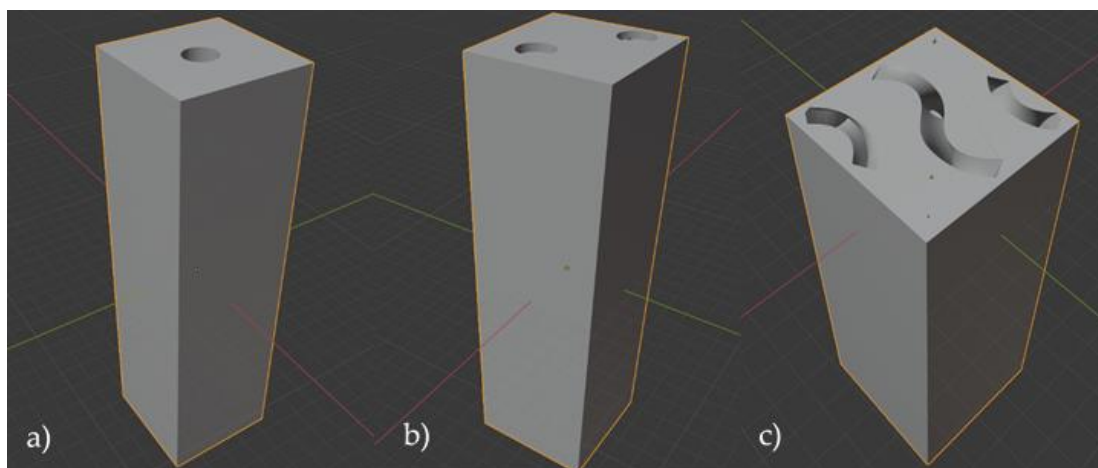
Para o fabrico da peça, projetou-se o molde em 3D com a utilização do *software* Matlab e, em segunda instância, trabalhou-se a estrutura com o *software* de desenho Blender. Mais detalhadamente com a utilização do Matlab conseguiu-se criar o modelo giróide através da sua fórmula matemática descrita anteriormente. Portanto, cria-se a superfície 3D do modelo giróide com os períodos pretendidos. Em seguida, como se precisa de trabalhar esta superfície, atribuindo-lhe espessura, usa-se o *software* Blender de modo a desenhar a estrutura com o gradiente de densidades que é pretendido, como se pode observar na Figura 3.1. Através do Blender, cria-se o design da estrutura numa extensão CAD. Este ficheiro é aberto pelo *software* CURA que faz o *slicing* da peça, permitindo ser lido pela impressora 3D.

Idealmente o método de PR a utilizar seria a impressão direta por extrusão de pastas. Contudo, como a estrutura desenhada não apresenta camadas sobrepostas iguais uma vez que é uma estrutura irregular, a impressora de pastas (*ZMorph VX*) não permite sobrepor *layers* de diferentes geometrias, sendo uma limitação desta impressora. Assim, optou-se por imprimir um molde de PVA com a impressora de filamento (*Ultimaker 3*), através do método de PR por modelagem de deposição de material fundido. Assim sendo, desenha-se o negativo da estrutura e obtém-se os canais exemplificados na Figura 3.2. De forma a uma melhor perceção gera-se uma caixa com uma entrada para a seringa de injeção e dois locais opostos de saída para certificar que a pasta está bem compactada e não existe espaços vazios ou bolhas de ar. Pode-se visualizar esta estrutura em diferentes ângulos na Figura 3.2.

Posteriormente à produção da pasta e impressão do molde da estrutura, injeta-se a pasta e deixa-se a peça em secagem à temperatura ambiente por um período não inferior a 48 horas. Passado esse período, coloca-se a peça numa tina com água milipore de modo a não existir contaminações com minerais e metais indesejáveis, sob agitação orbital (100 rpm). De referir que para uma melhor dissolução do PVA, deve-se ter o gobelé num agitador orbital por um período não inferior a 24 horas. Por último, as estruturas são limpas com água milipore e secas ao ar. Em seguida, realiza-se uma lavagem às mesmas em etanol 70% durante sensivelmente 20 a 30 minutos, de modo a remover restos residuais de DCM. Conserva-se as peças em caixas de Petri esterilizadas.



Figura 3.1 - Representação lateral da peça com exposição do gradiente de densidade.



*Figura 3.2 - Diferentes ângulos de visualização: a) Local de injeção; b) Local de saída; c) Corte transversal.*

## 3.2 Técnicas de caracterização dos pós de hidroxiapatite

### 3.2.1 Picnometria

A picnometria foi realizada de modo a identificar a massa específica e a densidade dos pós de HAp. A análise picnométrica realizou-se num picnómetro *MicroMeritics AccuPyc 1330*, através da comparação entre a variação da pressão de hélio na câmara da amostra e na câmara de volume calibrado. Assim sendo, procedeu-se à secagem da amostra (massa igual a 2.2859 g) e, em seguida, colocou-se no interior da câmara do aparelho. O ensaio foi realizado a uma temperatura de 25.7 °C e repetiu-se por 6 vezes.

### 3.2.2 Granulometria

A análise granulométrica permite a determinação das dimensões das partículas do agregado, bem como as suas respetivas percentagens de ocorrência. Os testes granulométricos foram realizados num granulómetro *MASTERSIZER Hydro 2000MU*, através do método por difração da radiação laser. Com efeito, foi criada uma suspensão de pós de HAp em água destilada a 2000 rotações por minuto. De modo a evitar agregações, a suspensão foi previamente dispersa com recurso a uma ponta de ultrassons, durante 30 segundos. Em seguida, repetiu-se o ensaio 10 vezes e os resultados de cada teste foram obtidos em menos de 1 minuto.

## 3.3 Técnicas de caracterização das amostras

Para a resolução do trabalho experimental, foi fundamental a utilização das seguintes técnicas de caracterização: (i) ensaios reológicos; (ii) ensaios mecânicos, (iii) estudos de caracterização morfológica, (iv) ensaios de bioatividade e (v) ensaios de citotoxicidade. De salientar que os testes reológicos e os ensaios de bioatividade foram realizados no Departamento de Ciência dos Materiais da FCT/UNL. Já a caracterização morfológica e os ensaios mecânicos foram realizados no CENIMAT/I3N. E, por fim, os ensaios de citotoxicidade foram realizados no laboratório de cultura celular do Departamento de Física da FCT/UNL.

### 3.3.1 Ensaios de Reologia

Curvas de fluxo foram obtidas utilizando um reômetro ANTON PAAR, modelo *MCR502*. A geometria *Parallel-plate* com 25 milímetros de diâmetro foi utilizada, sendo que este sistema é recomendado para pastas e polímeros altamente viscosos. Os estudos reológicos foram realizados a 25 °C e aplicaram-se taxas de corte entre 0,1 e 100 s<sup>-1</sup>. Assim, obtiveram-se curvas de fluxo para as pastas imediatamente após serem produzidas, 1 hora e, por último, 2 horas. As formulações testadas foram: (i) 90/10; (ii) 80/20 e (iii) 70/30 wt% de HAp/PCL, numa proporção volúmica de solventes igual a 10:4:2 (DCM, 2-Bu e DBP, respetivamente).

### 3.3.2 Ensaios Mecânicos

A peça observada na Figura 3.1, devido a ligeiros erros de impressão e solidificação da pasta, apresentou uma ligeira inclinação e como se está perante uma peça esbelta, isto é, uma peça em que a sua área de seção transversal é pequena em comparação ao seu comprimento, poderia acontecer o efeito de varejamento. Com efeito, isto poderia provocar uma falha inoportuna e inesperada durante os ensaios de compressão, pelo que se teve de encontrar uma solução. Assim sendo, como a espessura das paredes da estrutura varia entre os 0.6-1 milímetros, optou-se por produzir peças com espessura unitária de tamanhos muito específicos de 0.6 mm, de 0.8 mm e de 1.0 mm, de modo a diminuir a altura da peça e, por conseguinte, eliminar o efeito de varejamento. As peças tinham todas as mesmas dimensões, de largura, comprimento e altura iguais a 15, 15 e 23 milímetros, respetivamente. Podem-se observar estas estruturas produzidas na Figura 3.3. Para além das mesmas, foi produzida uma estrutura compacta (CC) com as dimensões 13 x 13 x 21 milímetros. Por fim, pesou-se cada amostra, calculou-se a área superficial total, o volume e determinou-se a densidade de cada estrutura. Estes valores podem ser analisados na Tabela 3.1. De referir que tanto a área superficial como o volume foram obtidos através da funcionalidade *3D-Print Analyze*, presente no *software Blender*.

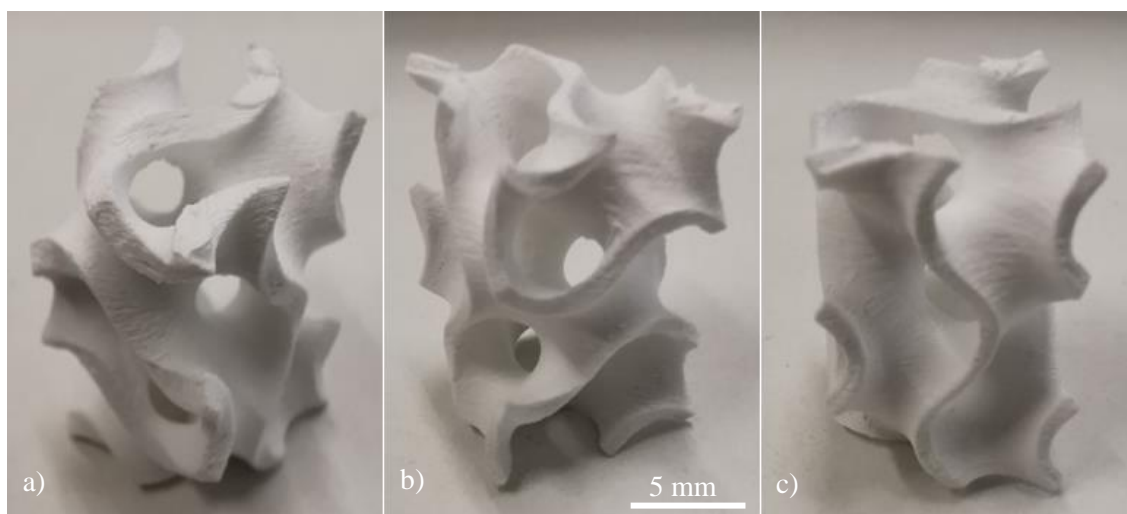


Figura 3.3 - Estruturas auxéticas com diferentes espessuras: a) 1.0 mm; b) 0.8 mm; c) 0.6 mm.

Tabela 3.1 - Massa, área superficial, volume e densidade de cada uma das amostras.

Amostra	Massa (g)	Área Superficial (cm <sup>2</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )
CC	4.34	14.3	3.5	1.22
1 mm	2.25	22.3	1.94	1.16
0.8 mm	1.83	22.3	1.65	1.11
0.6 mm	1.40	22.2	1.31	1.07

Os ensaios de compressão uniaxial foram executados nos laboratórios do Centro de Investigação de Materiais (CENIMAT) na Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL). O equipamento utilizado foi uma máquina universal de ensaios mecânicos *Autograph Shimadzu AG50kNG*, como se pode observar na Figura 3.4. A célula de carga utilizada nestes ensaios foi de 50kN e a aquisição de dados foi realizada através do *software Trapezium*. A velocidade de deslocação do travessão durante a execução dos ensaios foi de 1 mm/min, à temperatura ambiente, mantendo-se a sala climatizada para controlo da temperatura.



Figura 3.4 - Máquina Autograph Shimadzu.

### 3.3.3 Scanning Electron Microscope (SEM)

A técnica de SEM, denominada em português por Microscopia Eletrónica de Varrimento, é uma técnica de imagem utilizada que permite o estudo da morfologia e topografia da superfície a analisar. [86] Assim sendo, as amostras foram percorridas por um feixe de eletrões acelerado, no qual as energias tipicamente envolvidas estão compreendidas entre 0,5 keV e 50 keV. [87] Com o uso desta técnica foi possível observar materiais heterogéneos orgânicos ou inorgânicos em diferentes escalas de ampliação (em nanómetros ou em micrómetros). Neste estudo, foram tiradas imagens de cada uma das amostras com uma resolução de 1500x, 5000x de ampliação.

O SEM convencional é constituído por: (i) canhão de eletrões, responsável por emitir e acelerar o feixe de eletrões; (ii) sistema de vácuo, importante para o feixe de eletrões não entrar em contacto com outras moléculas presentes no tubo; (iii) sistema de lentes, no qual permitem a criação de um forte campo magnético no interior do tubo; (iv) sistema de detetores, no qual incluem o detetor de eletrões secundários e o detetor de eletrões retroespalhados como sendo os mais relevantes, uma vez que são estes que interagem com a zona superficial da amostra; e por último (v) câmara da amostra, espaço onde se coloca a amostra. Com efeito, o equipamento utilizado foi um Microscópio Eletrónico de Varrimento *HITACHI*, modelo *TM 3030 plus*.

Associado ao SEM e com o acoplamento dos detetores adequados, complementou-se a análise com a técnica de espectrometria de energia dispersiva, denominada por *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS), através da utilização do *software Quantax 70*. Esta ferramenta permitiu a visualização de imagens tridimensionais da amostra e obtém-se também informação sobre a composição química elementar dos materiais estudados. [88]

De referir que em materiais não condutores, torna-se necessário recorrer à deposição de uma fina película metálica nas superfícies das amostras, caso contrário a imagem obtida terá baixa definição devido a fenómenos de acumulação de carga. [51] Portanto, antes de colocar as amostras no SEM, estas foram colocadas numa máquina de *sputtering* (*Quorum Q150T ES*) para que se depositasse uma fina camada de irídio com o objetivo de melhorar ainda mais a condutividade elétrica.

### 3.3.4 Ensaio de Bioatividade

Para a realização dos testes foi preparada uma solução simuladora de fluido corporal (SBF - *Simulated Body Fluid*) com uma concentração iónica 1,5x a do plasma sanguíneo. Com efeito, colocou-se cada amostra, num tubo de ensaio, imersa em SBF numa estufa a 37 °C em agitação orbital. Segundo Kokubo, o volume de solução simuladora de fluido corporal ( $V_s$ ) que se coloca em cada uma das amostras é dada pela equação 3.1, em que  $S_a$  corresponde à área superficial aparente ( $\text{cm}^2$ ). [89]

$$V_s = \frac{S_a}{0.1} \quad 3.1$$

Tendo em conta que as pastilhas produzidas apresentam uma área superficial de  $1.5 \text{ cm}^2$ , a quantidade de solução em cada amostra foi de 15 mL. O tempo de imersão das amostras em solução de SBF foi de 6 horas, 12 horas, 18 horas, 1 dia, 3 dias e 7 dias. Em períodos de 48 horas, lavam-se as pastilhas com água destilada e recoloca-se novo SBF (só acontece para as amostras de 3 dias e 7 dias). No final de cada período de permanência dentro do SBF, as amostras foram retiradas da estufa, lavadas abundantemente com água destilada e secaram-se numa estufa a  $37^\circ \text{C}$ . Após secagem, as superfícies das amostras foram observadas pela técnica de SEM e as concentrações de iões cálcio e fosfato analisaram-se através da técnica de EDS.

Para produzir 1L de solução SBF, medem-se 700 mL de água milipore para um copo de precipitação. Coloca-se um agitador magnético e pausa-se sob uma placa de agitação num banho a  $37^\circ \text{C}$ . Em seguida, insere-se a ponta de medidor de pH devidamente calibrada e liga-se a placa de agitação com velocidade entre os 100 e 300 rotações por minuto. Adiciona-se as quantidades dos reagentes pela ordem descrita na Tabela 3.2. Ter em atenção que deve-se esperar cerca de 30 minutos entre os reagentes. Após a adição de Tris, deixar a solução sob agitação durante vários minutos sensivelmente entre 30-60 minutos. Com a ajuda de uma pipeta, adiciona-se gota a gota a solução ácida de 1M HCL até o pH ser próximo de 7.4. Por último, passa-se a solução para um bálaro volumétrico e adiciona-se água milipore até perfazer 1 L. A solução é guardada dentro do frigorífico e tem uma validade de 1 mês. [89]

*Tabela 3.2 - Lista de reagentes utilizados na produção de 1L de solução de SBF.*

Ordem	Reagente	Quantidade
1	Cloreto de cálcio (NaCl)	7.996 g
2	Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ )	0.350 g
3	Cloreto de Potássio (KCl)	0.224 g
4	Hidrogenofosfato dipotássico trihidratado ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	0.228 g
5	Cloreto de Magnésio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.305 g
6	Ácido clorídrico (HCl 1M)	40 mL
7	Cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2$ )	0.278 g
8	Sulfato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	0.071 g
9	Hidroximetilaminometano (Tris)	6.057 g



### 3.3.5 Ensaios de Citotoxicidade

De acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO), a realização de ensaios de citotoxicidade *in vitro* envolve a exposição de uma cultura de células ao material que se pretende testar, em modo direto ou através de um extrato. [90]

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando o método do extrato. Como os materiais desenvolvidos se destinam à regeneração óssea, a linha celular escolhida foi a Saos-2, células provenientes do sarcoma do osso.

No primeiro dia do ensaio, as amostras foram esterilizadas em etanol 70% durante 20 minutos. Procede-se à pesagem da amostra de modo a quantificar a quantidade de meio de cultura a pipetar. A amostra usada, de massa igual a 364 mg, foi suspensa em 2 mL de meio de cultura (McCoy) e aí foi mantida durante 48 horas, numa incubadora a 37 °C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, de modo a produzir um extrato com uma concentração de 182 mg/mL

No segundo dia, foi preparada uma placa de cultura de 96 poços com células Saos-2 semeadas com uma densidade de 30000 células por cm<sup>2</sup>. Prepararam-se 28 poços de modo a testar o extrato original, quatro diluições e dois controlos de células com quatro réplicas para cada condição. A placa colocou-se na incubadora referida acima por um período de 24 horas. De notar que as diluições realizadas foram C<sub>0/2</sub>, C<sub>0/4</sub>, C<sub>0/8</sub> e C<sub>0/16</sub>, sendo que C<sub>0</sub> corresponde à concentração de extrato original produzida.

No terceiro dia, os meios de cada poço são aspirados e são substituídos pelos extratos produzidos no primeiro dia. Ao controlo positivo (C+) foram adicionados 10 µL de dimetilsulfóxido (composto extremamente citotóxico) de modo a causar morte celular. Ao controlo negativo (C-) foi feita uma mudança de meio. Este controlo é a consiste num ambiente não citotóxico que servirá de referência para comparação dos extratos. A placa colocou-se novamente na incubadora por um período de 48 horas.

No quarto e último dia, o meio contido em cada poço é aspirado e utiliza-se um meio com resazurina, isto é, 50% de meio de cultura e 50% de solução de resazurina a 0.04 mg/ml em PBS (solução tampão fosfato-salino). É preparado um controlo de meio (CM) em que a solução de resazurina é colocada em poços sem células. A placa é colocada dentro da incubadora durante 3 horas. Durante este período, a resazurina é reduzida a resorufina pelas células metabolicamente ativas. [91] Após incubação, com a utilização do leitor de placas *Biotek ELX800*, medem-se as absorvâncias de cada poço a 570 nm (comprimento de onda (cdo) de absorvância máxima da resorufina) e a 600 nm (cdo máximo de absorvância da resazurina). [91]

Para a realização dos cálculos de viabilidade celular, segundo a equação 3.2, calcularam-se os valores médios de absorvância para as 4 réplicas da amostra ( $A_{amostra}$ ) e subtraiu-se pelo valor de absorvância do CM ( $A_{CM}$ ). Em seguida, procedeu-se à normalização dos dados para se obter os valores de viabilidade celular numa escala de 0-100%. De referir que para cada um dos valores de viabilidade celular encontrados foi calculada uma incerteza padrão combinada associada, segundo a equação 3.3.

$$Viabilidade\ Celular = A_{amostra} - A_{CM} \quad 3.2$$

$$Incerteza\ Padrão = \sqrt{\sigma_{amostra}^2 + \sigma_{CM}^2} \quad 3.3$$

Importante mencionar que, para além dos ensaios de citotoxicidade às amostras produzidas, realizaram-se ainda testes de citotoxicidade individuais aos materiais utilizados, nomeadamente, a hidroxiapatite, o 2-butoxietanol e ainda o dibutilftalato. Não se realizaram testes à policaprolactona, devido ao seu elevado número de estudos já realizados, nem ao diclorometano, uma vez que é um composto altamente tóxico e cancerígeno. [91,92] Assim sendo, foram utilizados os seguintes volumes: 2 mL de meio McCoy para 400 mg de HAp comercial, 0.33 mL de 2-butoxietanol e ainda 0.17 mL de dibutilftalato nos poços de C<sub>0</sub>. De referir que o procedimento realizado é igual ao descrito anteriormente. É importante referir que a preparação do controlo de células para os três materiais foi igual, apesar de serem incubados em placas diferentes.



## Análise e Discussão de Resultados

Neste capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos. Inicialmente, apresentam-se as curvas reológicas de cada formulação de pasta e, em seguida, faz-se uma análise macroscópica da estabilidade estrutural de cada amostra. Posteriormente, estudam-se os resultados dos ensaios de compressão uniaxial às estruturas de maneira a compreender a influência que tem a densidade das estruturas. Além disso, são revelados os resultados dos ensaios de bioatividade de modo a visualizar se existe formação da camada de hidroxiapatite carbonatada (HCA). Por último, discute-se os resultados relativos aos ensaios de citotoxicidade.

### 4.1 Caracterização do pó de hidroxiapatite

#### 4.1.1 Picnometria

Através da análise dos resultados presentes na Tabela 4.1, verificou-se que a HAP comercial utilizada apresenta uma densidade ligeiramente mais baixa que o valor padrão ( $3.16 \text{ g/cm}^3$ ), especificamente igual a  $2.9619 \pm 0.0132 \text{ g/cm}^3$ . [45]

*Tabela 4.1 - Resultados dos ensaios de picnometria aos pós de hidroxiapatite.*

Repetição	Densidade ( $\text{g/cm}^3$ )	Desvio-padrão ( $\text{g/cm}^3$ )
1	2.9803	0.0184
2	2.9739	0.0120
3	2.9615	0.0004
4	2.9587	0.0031
5	2.9508	0.0111
6	2.9461	0.0158

#### 4.1.2 Granulometria

Através da análise granulométrica às partículas de HAp comercial, verifica-se um tamanho de partícula com um pico máximo nos 8.7  $\mu\text{m}$ . Com efeito, mesmo a distribuição, verificada pela Figura 4.1, possuir um intervalo de tamanho de partícula muito grande (entre 1-100  $\mu\text{m}$ ), conclui-se que o tamanho médio das mesmas é da ordem nos micrómetros, mais especificamente por volta dos 10  $\mu\text{m}$ . Com efeito, o procedimento experimental utilizado seguiu o trabalho de *Adam E. Jakus et al.*, no qual utilizaram um tamanho de partícula de HAp entre 20-30  $\mu\text{m}$ . [94] Assim sendo, pode-se concluir que a HAp comercial apresenta um tamanho aceitável para a continuação do trabalho.

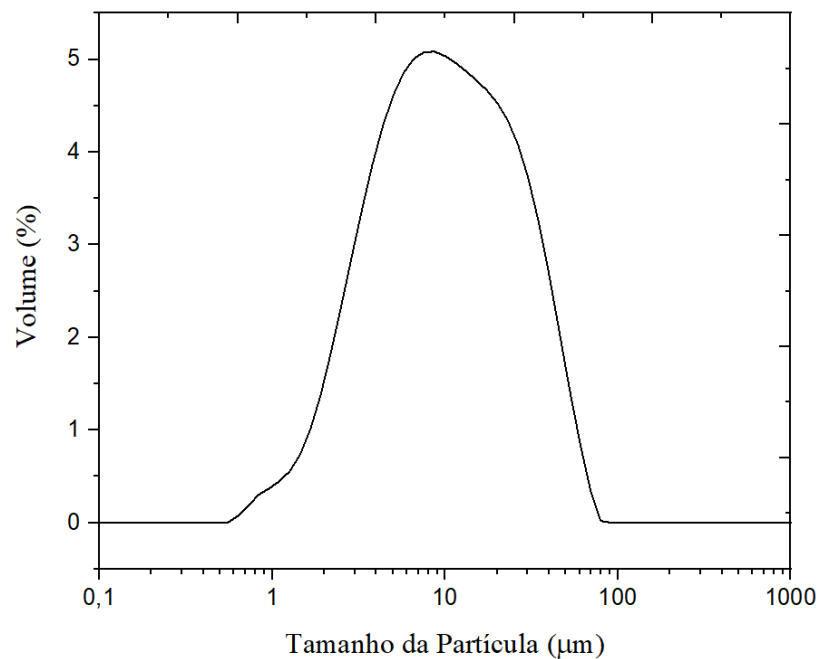


Figura 4.1 - Resultados dos ensaios de granulometria aos pós de hidroxiapatite.

## 4.2 Desenvolvimento da pasta e produção das estruturas 3D

Tal como referido no capítulo anterior, inicialmente, foram realizadas várias formulações de modo a identificar qual a pasta que oferece uma estrutura mais estável, firme e resistente. Primeiramente, realizaram-se as curvas de fluxo de cada formulação de modo a perceber a influência da viscosidade na produção das peças. Assim sendo, recapitulando, as formulações efetuadas foram: (A) 90%/10% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:2:1; (B) 90%/10% HAp/PCL mas numa proporção volúmica de solventes igual a 10:4:2; (C) 80%/20% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:4:2; (D) 70%/30% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:4:2; (E) por último, 70%/30% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:4:2, todavia imediatamente antes da injeção de pasta, esta apresenta 70% de DCM evaporado. Encontra-se resumido na Tabela 4.2 as características principais de cada formulação para as peças produzidas.

*Tabela 4.2 - Resumo das características principais de cada formulação de pasta.*

Formulação	Características Principais
A	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Parte-se simplesmente com o toque;</li><li>2. Não aguenta a força gravítica;</li><li>3. Sem elasticidade;</li><li>4. Despedaça-se em pó.</li></ol>
B	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Apresenta alguma coesão;</li><li>2. Parte-se em pequenos grãos.</li></ol>
C	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Pequenas parcelas da estrutura;</li><li>2. Apresenta pouca elasticidade.</li></ol>
D	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Intacta com fissuras;</li><li>2. Elástica.</li></ol>
E	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Intacta sem fissuras</li><li>2. Elástica.</li></ol>

Na primeira formulação não se obteve nenhuma curva de fluxo, uma vez que a pasta solidifica demasiado rápido e, por conseguinte, a geometria de leitura fica a deslizar sobre a pasta, logo os dados perdem a sua veracidade. Isto deve-se ao facto da pouca quantidade de solventes e da elevada volatilidade do DCM (ponto de ebulição de 39-40 °C). [95]

Na segunda formulação, devido à maior quantidade de solventes, nomeadamente o 2-butoxietanol e o dibutilftalato, sendo que estes são pouco voláteis, a pasta já não seca ficando possível traçar as curvas de fluxo, expostas na Figura 4.2. É visível que quanto menor a concentração de DCM, devido à sua evaporação ao longo do tempo, mais viscosas tornam-se as pastas. Na terceira formulação, as curvas de fluxo estão expostas na Figura 4.3, sendo que seguem o mesmo padrão que a anterior. Na quarta formulação, as curvas de fluxo são exibidas na Figura 4.4 e mais uma vez verifica-se o mesmo comportamento.

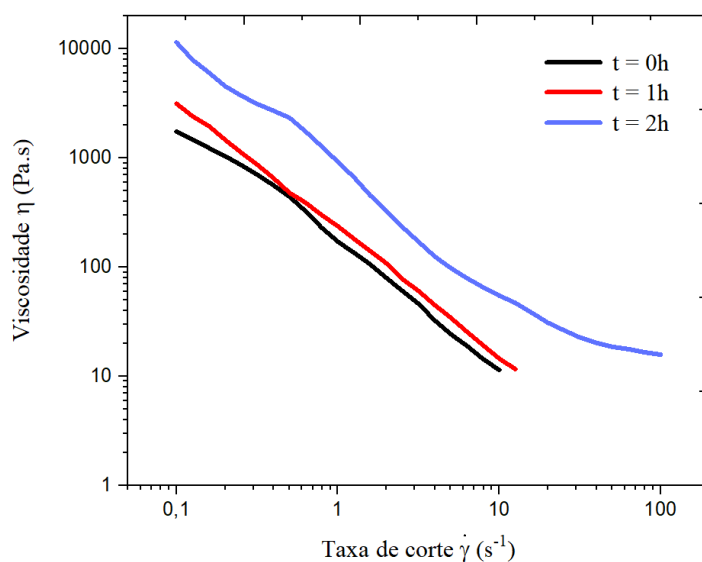


Figura 4.2 - Curvas de fluxo da 2ª formulação para diferentes tempos.

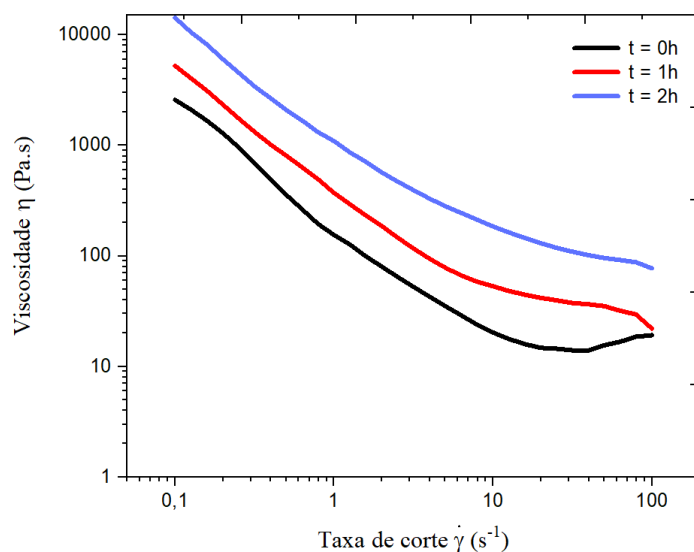


Figura 4.3 - Curvas de fluxo da 3ª formulação para diferentes tempos.

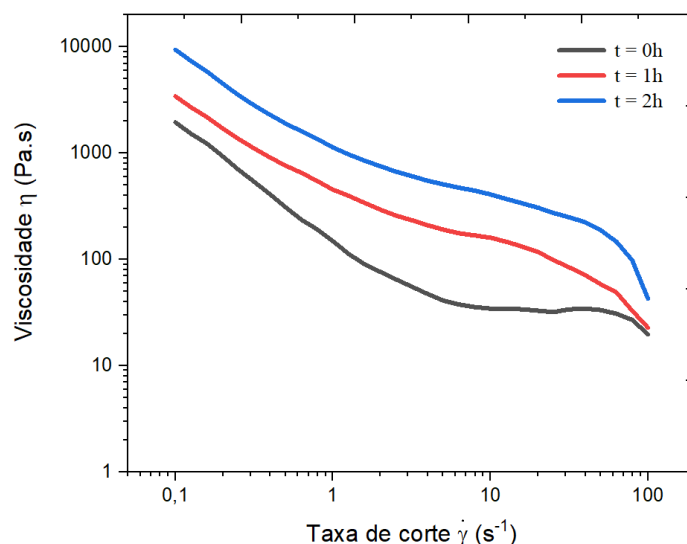


Figura 4.4 - Curvas de fluxo da 4ª formulação para diferentes tempos.

Na Figura 4.5 encontram-se as curvas de fluxo das formulações 90/10, 80/20 e 70/30 imediatamente após serem produzidas e após 2 horas. Com efeito, aquando realizadas, verifica-se que não existem diferenças significativas entre as formulações, comportando-se de maneira igual independentemente do rácio cerâmico-polímero. Após 2 horas, verifica-se que para taxas de corte até  $1 \text{ s}^{-1}$  as curvas comportam-se novamente de igual maneira, contudo a partir de  $1 \text{ s}^{-1}$  até  $100 \text{ s}^{-1}$ , existe uma clara diferença de comportamento, sendo que para uma maior percentagem de polímero, maior a viscosidade do material.

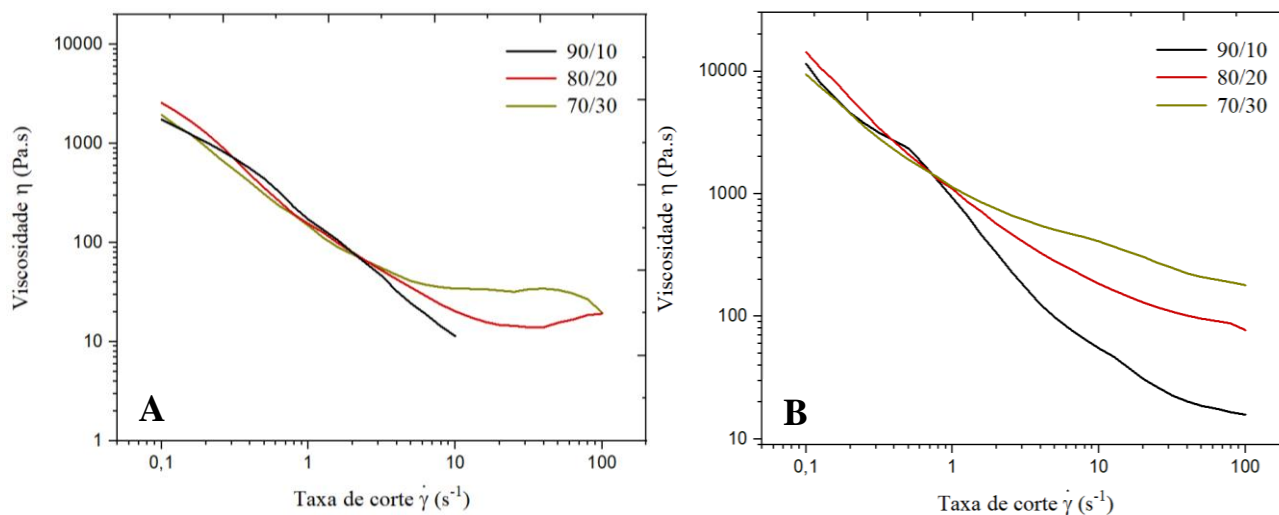


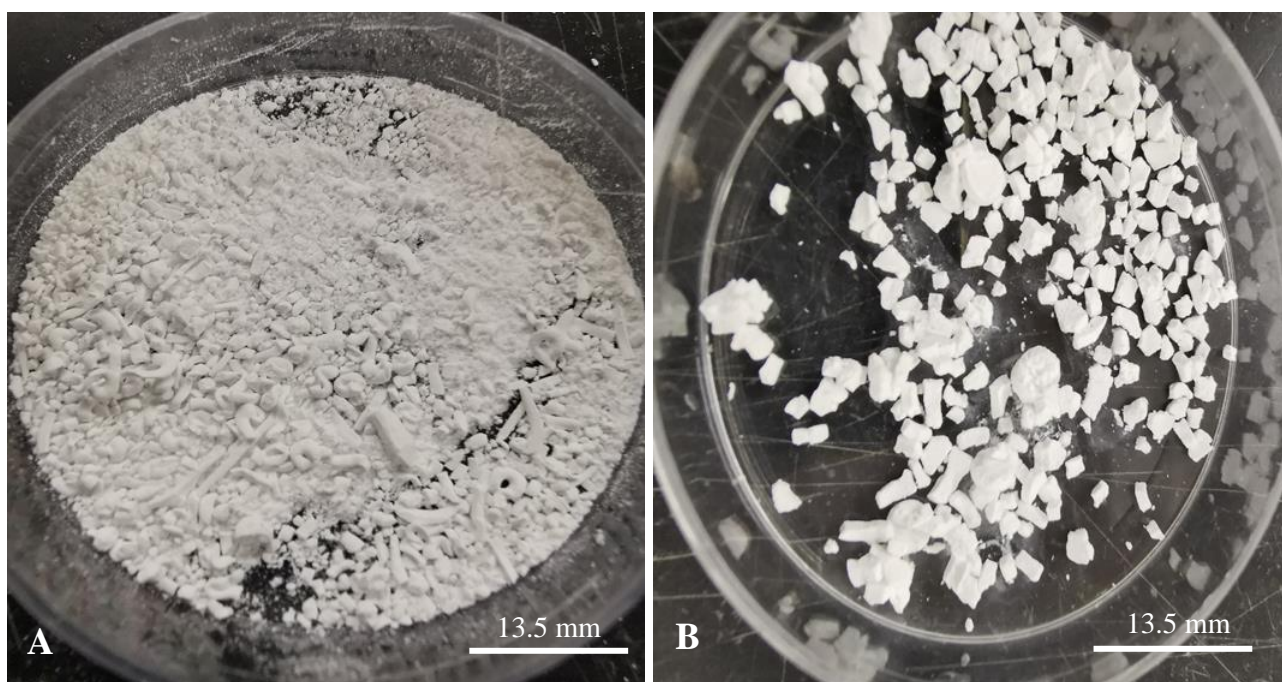
Figura 4.5 - Curvas de fluxo dos três rácios entre HAp e PCL: (A) Imediatamente após produção; (B) Após 2 horas.

Relativamente às curvas de fluxo, constata-se que as pastas apresentam comportamento reofluidificante, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento das taxas de corte. Com efeito, as taxas de corte são fortes o suficiente para obrigar o alinhamento das moléculas, facilitando o escorregamento entre estas e, por conseguinte, promove a diminuição da viscosidade do fluido. Este comportamento é típico de um líquido não-Newtoniano. [96]



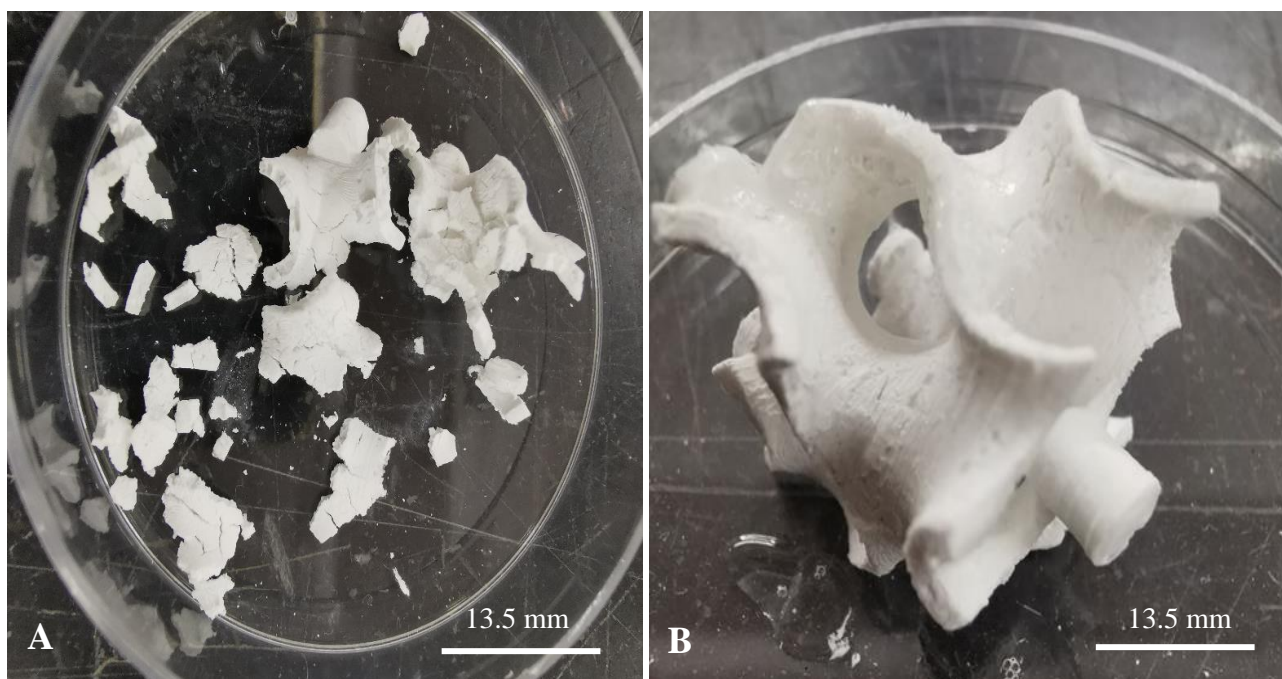
Tendo em conta que o diâmetro do canal de injeção de pasta é igual a 1.7 mm e os canais dentro dos moldes são sempre menores independentemente da espessura das paredes, independentemente de a pasta ser injetada a uma velocidade baixa, a taxa de corte dentro dos canais do molde é elevada e, como se está perante um líquido reofluidificante, a viscosidade baixa ao passar por estes canais, permitindo a injeção uniforme de pasta nos moldes. Nos momentos iniciais de evaporação ( $t = 0h$ ), como existe mais DCM nas pastas, estas são menos viscosas como se pode visualizar nos gráficos anteriores e, por consequente, a injeção de pasta nos canais do molde leva a taxas de corte mais elevadas que conduzem a viscosidades baixas. Isto pode permitir o escorrimento de pasta para determinadas zonas no molde por ação da gravidade. Contudo, a quantidade de polímero é preponderante para se obter a homogeneidade das estruturas, uma vez que quanto maior for a quantidade de polímero e menos quantidade de DCM conter a pasta, a viscosidade é alta o suficiente para que este efeito não se faça sentir. Com efeito, realizando a análise das curvas de fluxo e análise macroscópica em seguida, verifica-se que a curva de fluxo ideal para produzir as estruturas pretendidas é a curva verde presente na Figura 4.5 B. Assim sendo, quanto maior percentagem de polímero na pasta, para taxas de corte elevadas, maior viscosidade do material e, consequentemente, menor efeito de escorrimento, logo melhor homogeneidade das amostras obtidas.

Para a primeira formulação de pasta, as estruturas produzidas não se aguentam e simplesmente com a força da gravidade desfazem-se em pó. Na Figura 4.6, pode-se observar que existem pequenos grãos, mas maioritariamente a peça está desfeita em pó. Isto pode ser explicado por dois motivos distintos: pouca quantidade de polímero ou pouca quantidade de plastificante. Com o aumento da quantidade de DBP, as estruturas já não se desfazem em pó, contudo não se conseguem manter em forma, partindo-se em pequenos grãos, como se pode ver na Figura 4.6. A falta de estabilidade estrutural das peças nestas duas situações deve ficar-se a dever à baixa quantidade de polímero (ligante) usado na formulação das pastas.



*Figura 4.6 – (A) Material 90%/10% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:2:1; (B) Material 90%/10% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:4:2.*

Na terceira e quarta formulação, faz-se variar a relação entre a quantidade de cerâmico e polímero. Evidentemente que com o aumento de polímero, aumenta a quantidade de ligante que se tem nas estruturas, logo o material fica mais coeso e não se desfaz em pequenos grãos como anteriormente. Analisando a Figura 4.7, numa proporção de 80%/20% de HAp/PCL, respetivamente, a peça está reduzida em parcelas maiores e deve-se referir que o desmoronamento das paredes é devido principalmente aos canais no molde de PVA não estarem totalmente preenchidos, permitindo a dissolução do PVA desintegrar a estrutura facilmente. Com efeito, devido à pouca quantidade de polímero e ao efeito de escorrimento de pasta, a estrutura desmorona-se facilmente, acabando por sofrer diversas fraturas. Analisando a Figura 4.7, numa proporção 70%/30% de HAp/PCL, respetivamente, a peça conserva a sua forma, mantendo-se unida e coesa. Todavia, devido à evaporação do DCM presente na estrutura, a mesma contém diversas fissuras nas suas paredes que constituem defeitos que comprometem o desempenho mecânico das peças. De referir que as estruturas realizadas apresentavam apenas 30% do DCM evaporado imediatamente antes da injeção de pasta nos moldes.



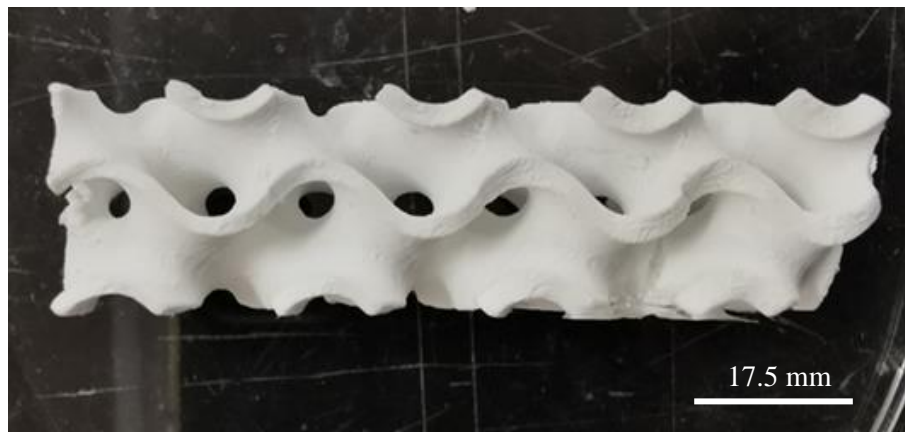
*Figura 4.7 - (A) Material 80%/20% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:4:2; (B) Material 70%/30% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:4:2.*

Aumentando a quantidade de DCM evaporado ( $t = 2h$ ), na formulação de 70% de HAp e 30% de PCL, pode-se comprovar a curva de fluxo anteriormente obtida, ou seja, para altas taxas de corte a viscosidade da pasta é tanto maior quanto maior a quantidade de PCL. Assim sendo, analisando a Figura 4.8, verifica-se que as superfícies são muito mais homogêneas, não apresentando qualquer tipo de fissura visível. Assim sendo, pode-se afirmar que esta é a melhor formulação para produzir as estruturas auxéticas com um gradiente de densidades.



*Figura 4.8 - Material 70%/30% HAp/PCL numa proporção de solventes igual a 10:4:2 com 70% de DCM evaporado.*

Na Figura 4.9, pode-se visualizar a estrutura final com a última formulação mencionada. A estrutura é constituída por um gradiente de densidades, na direção da altura da peça impressa, conseguido por variação da espessura da parede entre 0.6 mm e 1.0 mm (da esquerda para a direita na Figura 4.8).



*Figura 4.9 - Estrutura auxética final com gradiente de densidade uniaxialmente.*

### 4.3 Ensaios mecânicos

Tal como referido no capítulo anterior, aqui discutem-se os resultados obtidos dos ensaios mecânicos, mais especificamente ensaios de compressão uniaxiais. Com efeito, existem 4 amostras distintas: estrutura porosa com 0.6, 0.8 e 1.0 milímetros de espessura, e ainda uma estrutura cúbica compacta (CC) preenchida com pasta solidificada.

Curvas globais típicas de força-deslocamento são apresentadas na Figura 4.10, sendo possível identificar três regiões distintas: região linear-elástica, patamar de colapso e zona de densificação. Através da visualização da figura, na estrutura CC não existe patamar de colapso como nas estruturas porosas, existindo três zonas claramente diferenciadas: (i) zona linear-elástica até um deslocamento de 1.5 mm; (ii) zona elasto-plástica com aumento brando da força exercida entre 1.5-10 mm; (iii) zona elasto-plástica com aumento drástico da força aplicada, isto é, zona de densificação a partir dos 10 mm. Nas estruturas porosas, também existem três regiões bem definidas: (i) zona linear-elástica; (ii) patamar de colapso; (iii) zona de densificação. Verifica-se que existe uma dependência entre a espessura da parede e o patamar de colapso, ou seja, pela análise dos resultados, pode-se afirmar que quanto maior a densidade do material, maior a tensão associada a este patamar. Também se pode concluir que para uma maior espessura de parede, mais rapidamente se atinge a zona de densificação.

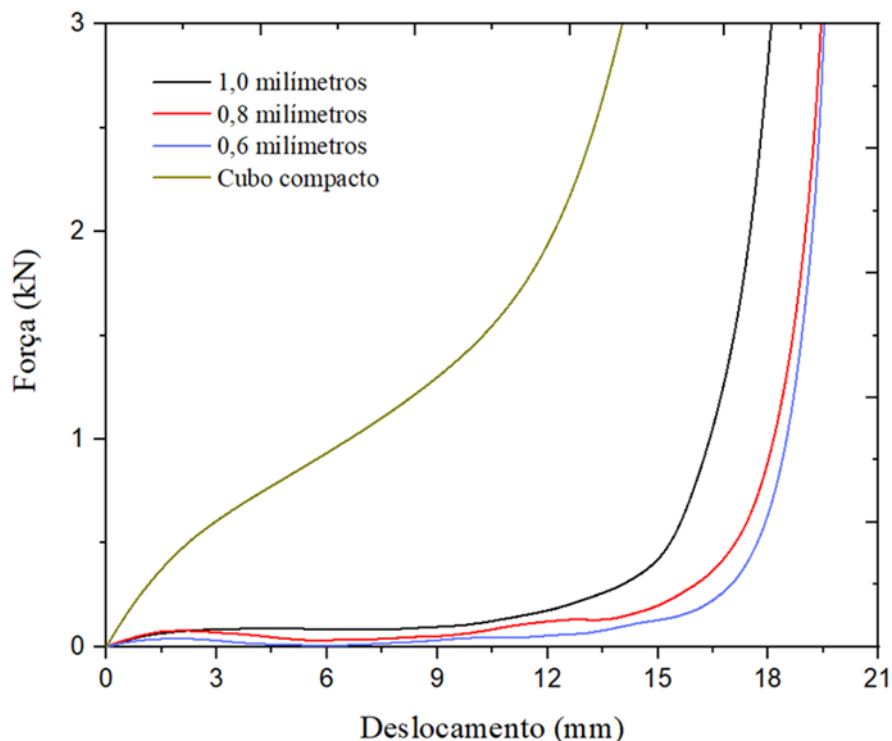


Figura 4.10 - Curvas típicas globais Força-Deslocamento para as 4 amostras.

Nas Figura 4.12, 4.13 e 4.15 podem-se visualizar os gráficos associados às curvas de Tensão-Deformação das amostras porosas. Através destes dados, analisou-se cada gráfico de forma independente.

Na primeira região, designada por zona linear-elástica, a curva tensão-deformação é aproximada a uma reta linear, cujo declive se traduz no módulo de Young. Ese comportameto deve-se à flexão das arestas e ao alongamento das paredes celulares. Não se verificam diferenças notórias entre as diversas amostras ensaiadas e os valores do módulo de Young estão expostos na Tabela 4.3. [29,96]

Na segunda região, isto é, depois de atingida a tensão limite de elasticidade, o material deforma-se plasticamente e observam-se pequenas variações de tensão para grandes variações de deformação. Nesta região dá-se o início do colapso das células por distorção (alongamento), rotação e/ou deslizamento das arestas e paredes celulares. Estes mecanismos de deformação dos poros encontram-se descritos na Figura 4.11. O ligeiro declive que existe nesta zona pode estar relacionado com a ocorrência de tensões nas paredes das células; caso existisse um fluido aprisionado nas células, a compressão daquele poderia constituir uma causa adicional para esse declive. [29] Nesta região, obtém-se a tensão de colapso, podendo determinar-se a capacidade de absorção de energia do material até atingir a zona de densificação. Estes valores estão expostos na Tabela 4.3.

Na última região, observa-se um aumento acentuado da tensão para pequenas variações de deformação. As células que sofreram colapso na zona do correspondente patamar são comprimidas adicionalmente, ocorrendo o seu esmagamento. Por conseguinte, a rigidez aumenta aproximando-se do valor característico do material sólido de base. [29]

Na curva Tensão-Deformação da estrutura CC, exposta na Figura 4.14, pode-se afirmar que não existe nenhuma zona com algum decréscimo de tensão na sua extensão e que continua a aumentar até ao fim da sua deformação completa. Este comportamento é típico de um material significativamente poroso, onde as células usufruem de espaços intersticiais para se recolocar. De referir ainda que este comportamento é muito idêntico ao que acontece no caso de o material ser borracha. [97,98,99]

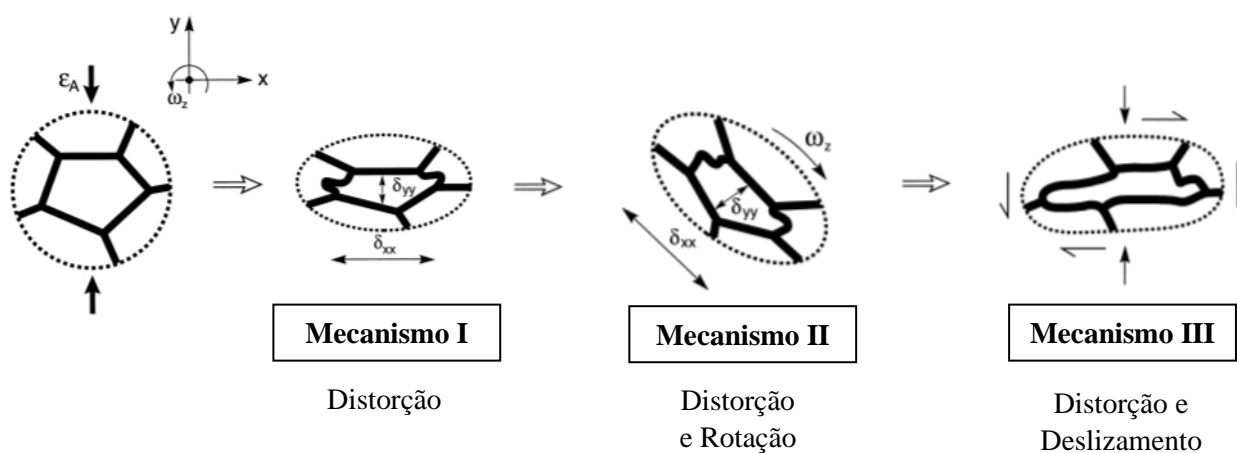


Figura 4.11 - Mecanismos de deformação dos poros. Adaptado de [97]

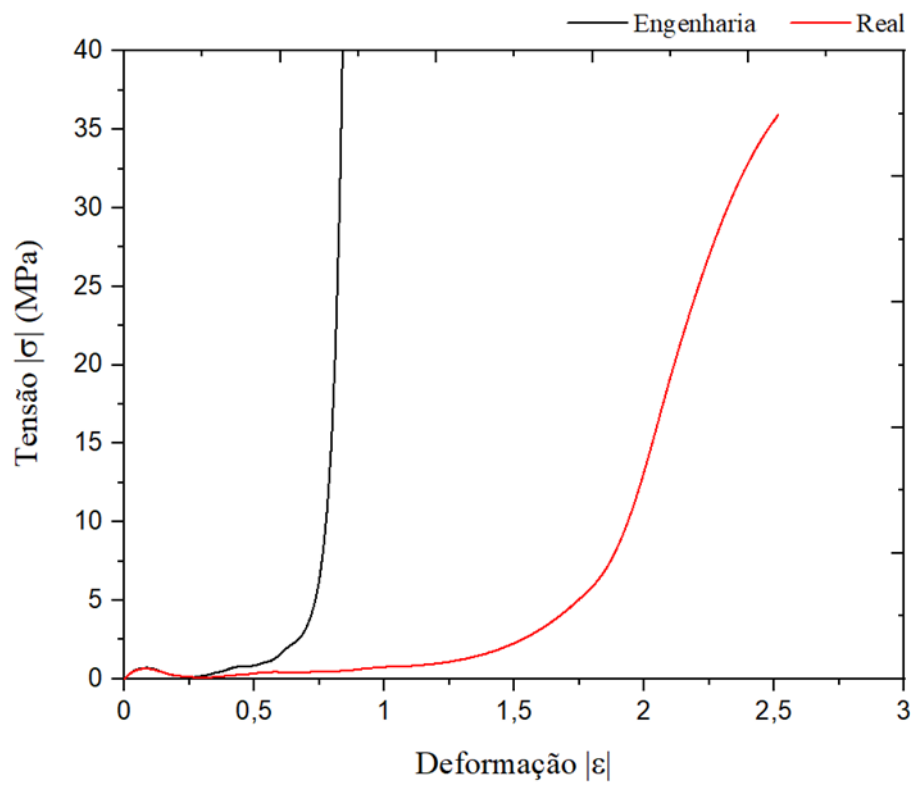


Figura 4.12 - Curva Tensão - Deformação para a amostra de 0.6 milímetros de espessura.

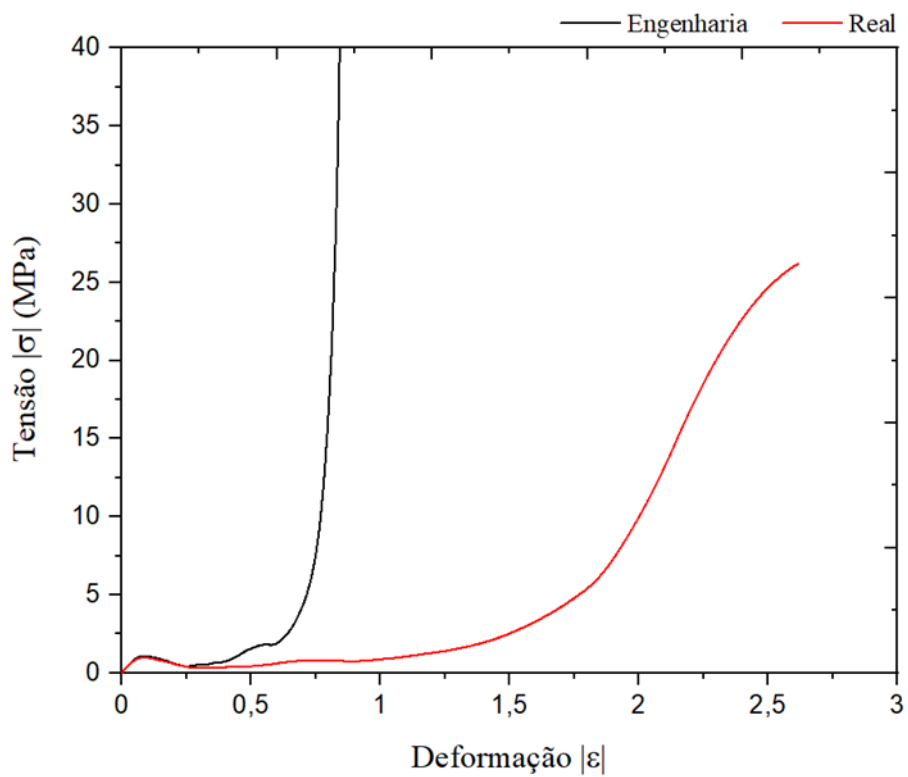


Figura 4.13 - Curva Tensão - Deformação para a amostra de 0.8 milímetros de espessura.



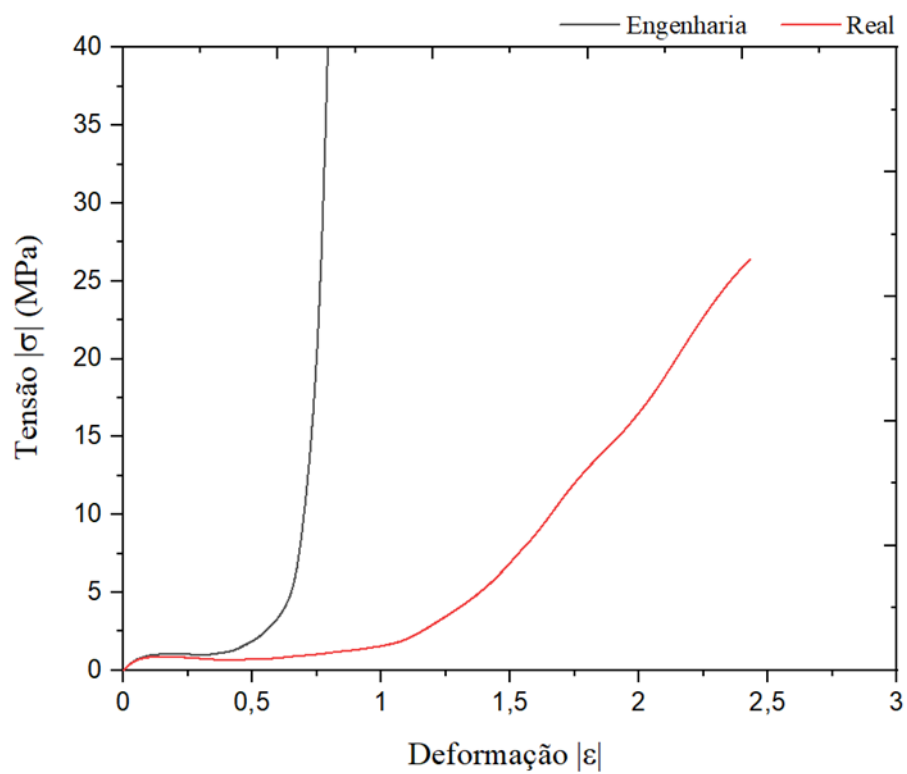


Figura 4.15 - Curva Tensão - Deformação para a amostra de 1.0 milímetros de espessura.

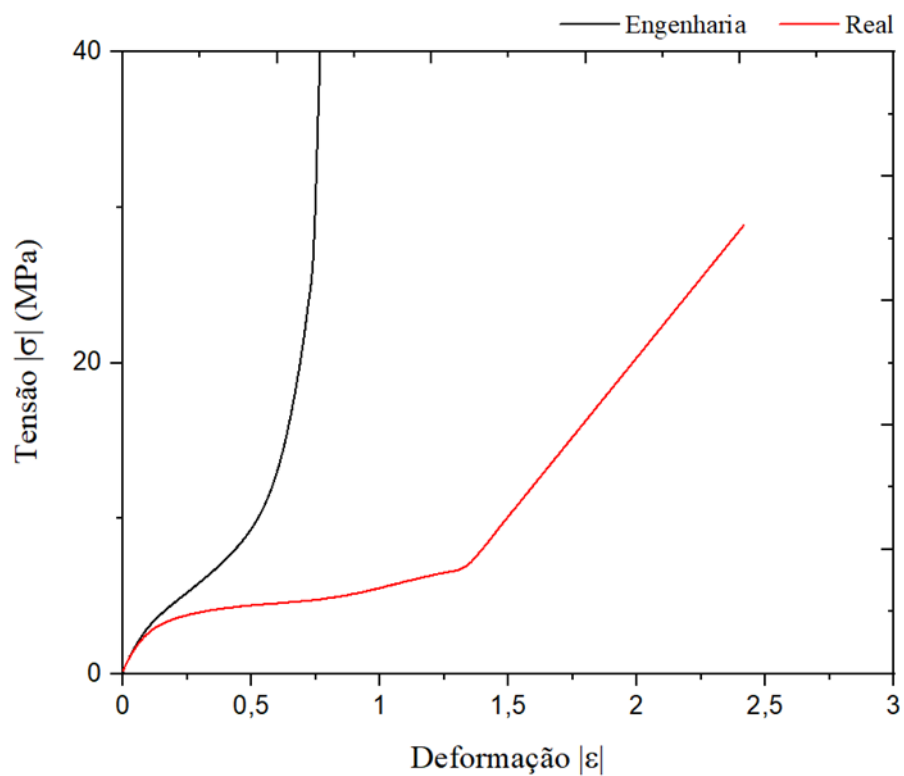


Figura 4.14 - Curva Tensão - Deformação para a amostra CC.

*Tabela 4.3 – Propriedades mecânicas das estruturas submetidas a esforços de compressão.*

<b>Estrutura</b>	<b>Módulo de Young (MPa)</b>	<b>Tensão de Colapso (MPa)</b>	<b>Deformação até à densificação (%)</b>	<b>Energia absorvida até à deformação de densificação (J/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Eficiência da absorção de energia (%)</b>
0.6 milímetros	15.9	0.339	83.0	2.19	21.7
0.8 milímetros	19.9	0.567	81.0	2.01	28.8
1.0 milímetros	15.5	0.891	72.0	1.49	33.7
CC	29.9		59.0	3.40	48.2

Pela análise da Tabela 4.3, claramente observa-se uma diferença significativa entre o módulo de Young do material denso e das estruturas porosas. Nestas últimas pouco se pouco concluir uma vez que apresentam valores bastante similares, ou seja, com os resultados obtidos, não é perceptível a influência da espessura da parede no módulo de Young. Em contrapartida, é evidente o aumento da tensão de colapso após aumentos na espessura. Com efeito, o material denso revela uma boa capacidade de absorção de energia, perto dos 50%. Este comportamento é de esperar uma vez que este material se comporta como uma espuma. [76]

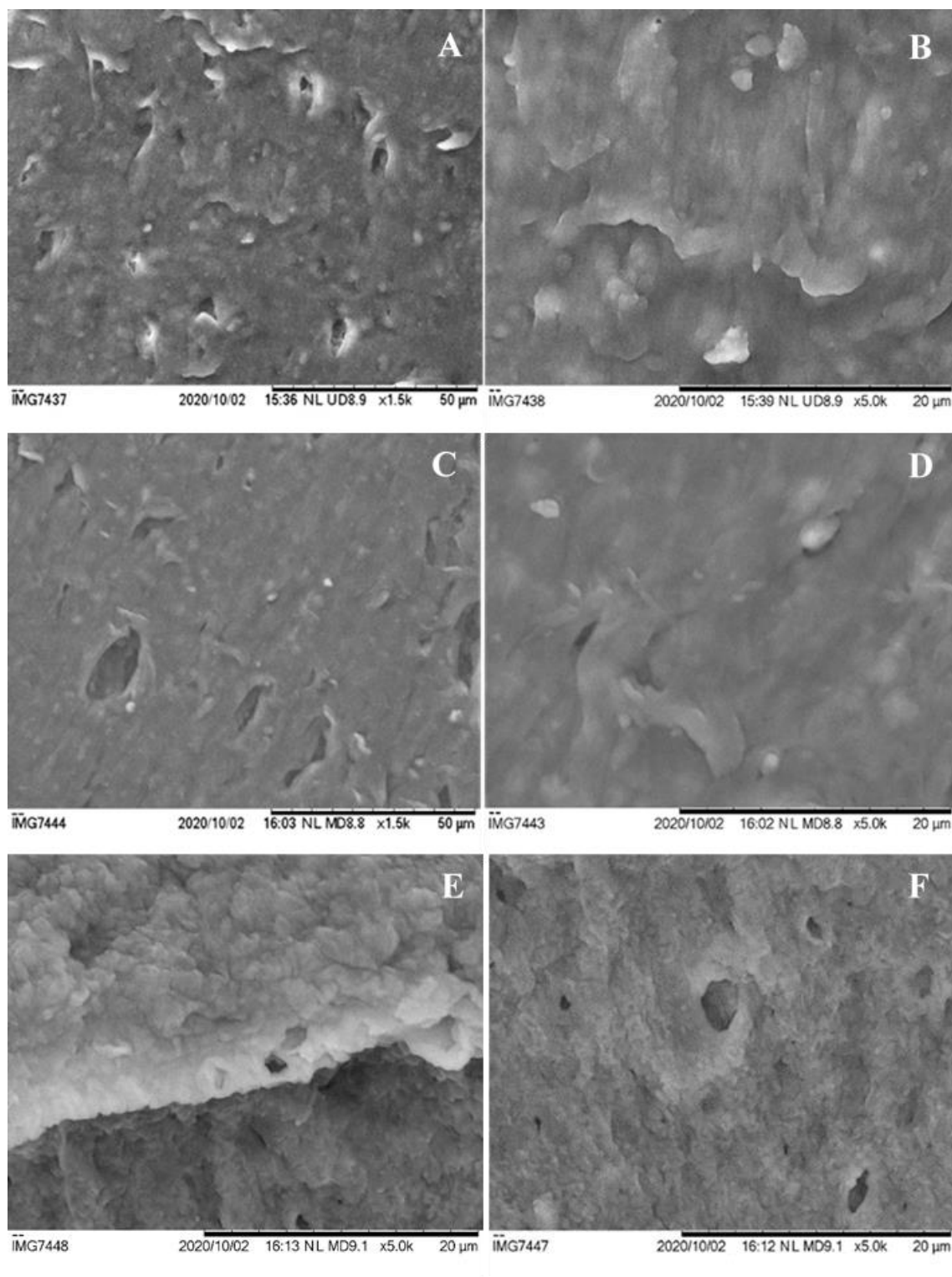


## 4.4 Ensaios de bioatividade

Um dos requisitos para que um biomaterial se ligue ao osso vivo consiste na possibilidade de se formarem, à sua superfície, apatites semelhantes ao osso. Através dos ensaios de bioatividade torna-se possível verificar *in vitro* a formação de apatites que ocorrem em processos *in vivo*. [101] De forma a avaliar a formação de apatites analisaram-se pastilhas produzidas com as pastas usadas para a produção das peças, com recurso a SEM e EDS. A formulação testada é a pasta que se utilizou na produção da peça final, ou seja, a mistura de 70%/30% de HAp/PCL, respetivamente, juntamente com uma mistura de solventes na proporção 10:4:2, com 70% de DCM evaporado. Em seguida, serão apresentadas e discutidas as imagens de SEM para cada pastilha e também serão discutidos os resultados de EDS através da visualização dos espectros para a amostra Controlo, 1 dia, 3 e 7 dias. De referir que para cada um dos tempos de imersão expostos, apresentam-se duas imagens com ampliações distintas, a 1500x e 5000x.

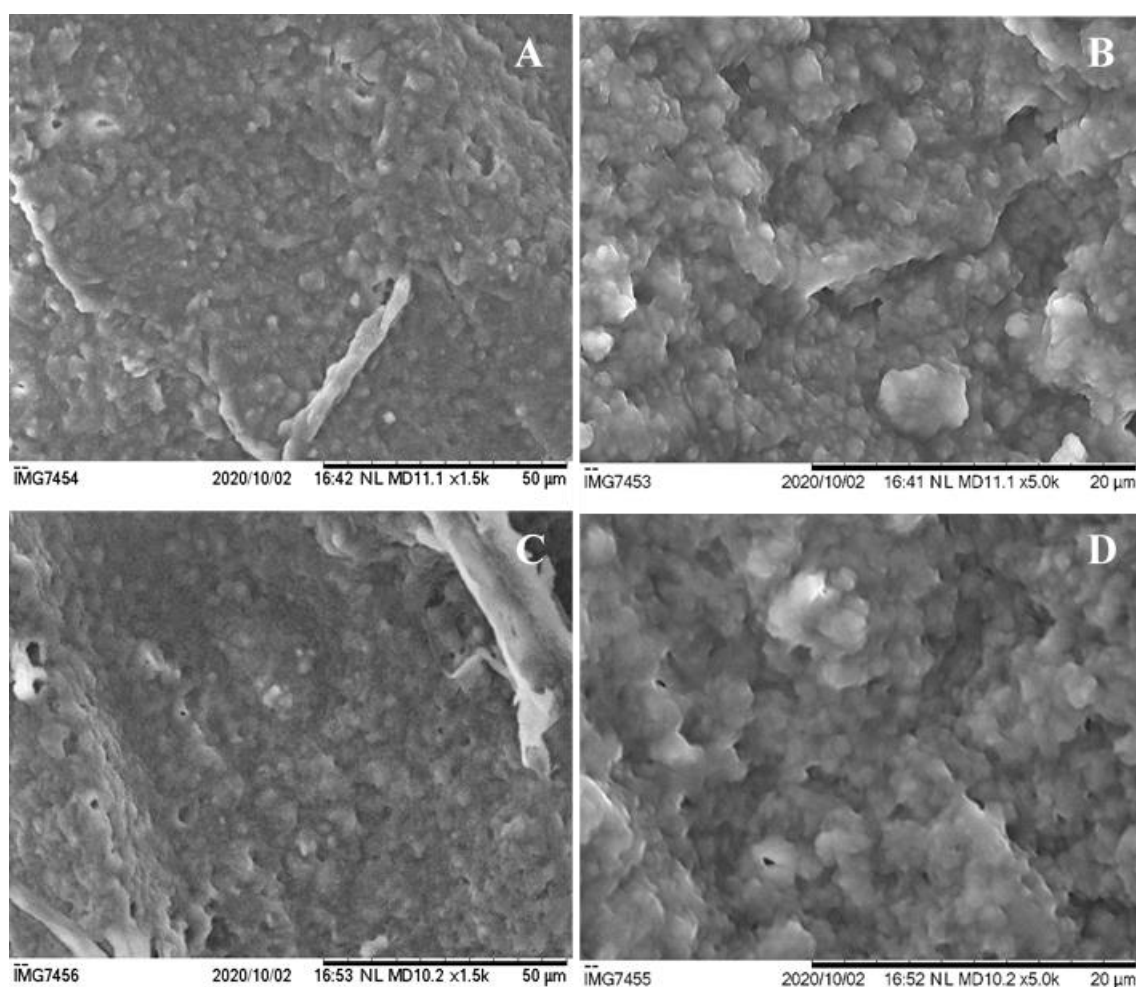
As imagens apresentadas na Figura 4.16 (A e B), com duas ampliações diferentes, são referentes à superfície da amostra não imersa em SBF (amostra Controlo). Assim pode-se verificar que a amostra não apresenta cristais de CaP na sua superfície. Tanto na primeira como na segunda ampliação pode-se observar uma uniformidade da superfície, apresentando alguns defeitos (falhas/fissuras) provavelmente devidos à evaporação de DCM. Com os espectros obtidos através da técnica de EDS, foi confirmada a presença de estruturas constituídas maioritariamente por Cálcio, Fósforo, Carbono e Oxigénio. Pode-se visualizar este espectro na Figura 7.1, presente nos Anexos. Através da análise deste espectro, verifica-se que não existe contaminação de metais e outros elementos químicos indesejáveis. Com efeito, calculando a razão molar entre Ca e P, confirmar um valor de aproximadamente 1.69, valor este muito próximo do correspondente à HAp.

Relativamente às imagens de SEM expostas na Figura 4.16 (C e D), pode aferir-se que decorridas 12 horas de imersão em SBF, as amostras não apresentam cristais de CaP na sua superfície. A camada superficial é semelhante à da amostra Controlo, onde se verifica muita uniformidade, não existência de fissuras e ainda apresenta buracos à vista. Contudo, na Figura 4.16 (E e F), após 24 horas de imersão em SBF já se identifica uma camada de precipitação de HCA, associada à alteração de rugosidade da superfície que se observa. O espectro referente à análise de EDS da amostra de 24 horas pode-se visualizar na Figura 7.2, presente nos Anexos.



*Figura 4.16 – Imagem de SEM da superfície da amostra: Controlo (A) ampliação 1500x, (B) ampliação 5000x; imersa durante 12 horas (C) ampliação 1500x, (D) ampliação 5000x; imersa durante 24 horas (E) ampliação 1500x, (F) ampliação 5000x.*

Na Figura 4.17, estão expostas as imagens de SEM referentes à imersão em SBF durante 3 dias e 7 dias. É visível que ao fim destes dias as superfícies são muito idênticas e apresentam uma rugosidade, consistente com a precipitação de cristais apatíticos, não visível na amostra controle. Pela análise das imagens de maior ampliação identificam-se aglomerados formados pelos cristais apatíticos. Tanto na superfície de 3 dias como na de 7 dias já não se visualizam os defeitos existentes na superfície da amostra de controle, o que significa que toda a superfície se encontra coberta por uma camada destes cristais. Portanto, a camada de CaP que se formou ao longo dos 7 dias, aumentou gradualmente a sua espessura. Pela análise dos dados, referentes à técnica de EDS, consegue-se calcular a razão molar entre Ca e P nos 3 dias e nos 7 dias, sendo igual a 1.51 e 1.54, respetivamente, o que é consistente com a formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfo (ACP). [102] Os espectros obtidos pela técnica EDS, referentes ao 3º e 7º dia podem ser observados na Figura 7.3, presente nos Anexos.



*Figura 4.17 - Imagem de SEM da superfície da amostra: imersa durante 3 dias (A) ampliação 1500x, (B) ampliação 5000x; imersa durante 7 dias (C) ampliação 1500x, (D) ampliação 5000x.*

*Tabela 4.4 - Elementos químicos detetados nas superfícies das amostras pela análise de EDS.*

<b>Amostra</b>	<b>Carbono (wt %)</b>	<b>Oxigénio (wt %)</b>	<b>Cálcio (wt %)</b>	<b>Fósforo (wt %)</b>	<b>Razão Molar (Ca/P)</b>
Controlo	49.00	31.52	12.25	7.23	1.69
1 dia	59.92	29.49	5.37	5.22	1.02
3 dias	47.96	29.40	13.61	9.03	1.51
7 dias	50.70	29.33	12.10	7.87	1.54

Tendo em mente que a análise EDS analisa até uma profundidade de poucos microns, na Tabela 4.4, podem-se observar os diferentes elementos químicos detetados pela análise de EDS. Importante mencionar que após 24 horas, a razão molar entre Ca/P varia significativamente uma vez que a formação da camada apatítica deve-se a um fenómeno de dissolução/precipitação. Com efeito, até que a camada de HCA esteja formada e, posteriormente, comece a cristalizar, esta razão irá variar.

## 4.5 Ensaio de Citotoxicidade

A realização de testes de biocompatibilidade *in vitro* apresenta inúmeras vantagens, contudo a principal é permitir claramente identificar materiais potencialmente citotóxicos numa fase inicial, devido ao facto de apresentarem uma elevada sensibilidade. [25]

Para analisar os resultados de viabilidade celular é necessário ter em ponderação quatro denominações, consoante a percentagem de viabilidade celular que se obtém. Assim sendo, para valores superiores a 90% o material é considerado não citotóxico, entre 80% e 89% considera-se levemente citotóxico, entre 50% e 79% é moderadamente citotóxico e caso seja inferior a 50% então assume-se como severamente citotóxico. [103] Na Tabela 4.5, estão expostos os resultados obtidos com o respetivo cálculo da viabilidade celular e suas incertezas.

*Tabela 4.5 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade às amostras.*

<b>Amostra</b>	<b>Absorvância Média</b>	<b>Absorvância Final</b>	<b>Viabilidade Relativa (%)</b>	<b>Incerteza Padrão (%)</b>
<b>C<sub>0</sub></b>	0.395	0.597	102	±2
<b>C<sub>0/2</sub></b>	0.394	0.596	102	±4
<b>C<sub>0/4</sub></b>	0.431	0.633	109	±3
<b>C<sub>0/8</sub></b>	0.364	0.566	97	±3
<b>C<sub>0/16</sub></b>	0.385	0.587	101	±5
<b>C<sub>+</sub></b>	-0.204	-0.002	0	±3
<b>C<sub>-</sub></b>	0.382	0.584	100	±3
<b>C<sub>CM</sub></b>	-0.202			

Através da análise dos resultados, pode-se verificar que os valores de viabilidade relativa normalizada são todos superiores a 90% com incertezas entre 3-5%. Assim sendo, pode-se afirmar que para todas as concentrações testadas, o material é não citotóxico, pelo que não é de esperar que o implante cause morte celular *in vivo* devido à libertação para o meio fisiológico de agentes citotóxicos.

Relativamente aos testes citotóxicos de cada material estudado, os resultados referentes à HAp, 2-Bu e DBP podem ser observados na Tabela 4.6, 4.7 e 4.8, respetivamente.

*Tabela 4.6 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade ao pó de hidroxiapatite.*

<b>Amostra</b>	<b>Absorvância Média</b>	<b>Absorvância Final</b>	<b>Viabilidade Relativa (%)</b>	<b>Incerteza Padrão</b>
<b>C<sub>0</sub></b>	0.464	0.665	105	±3
<b>C<sub>0/2</sub></b>	0.476	0.677	107	±1
<b>C<sub>0/4</sub></b>	0.466	0.667	105	±1
<b>C<sub>0/8</sub></b>	0.423	0.624	98	±1
<b>C<sub>0/16</sub></b>	0.428	0.629	99	±5
<b>C+</b>	-0.191	0.011	2	±1
<b>C-</b>	0.433	0.634	100	±2
<b>C<sub>CM</sub></b>	-0.201			

*Tabela 4.7 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade ao composto 2-butoxietanol.*

<b>Amostra</b>	<b>Absorvância Média</b>	<b>Absorvância Final</b>	<b>Viabilidade Relativa (%)</b>	<b>Incerteza Padrão</b>
<b>C<sub>0</sub></b>	-0.188	0.0123	3	±2
<b>C<sub>0/2</sub></b>	-0.168	0.0323	7	±2
<b>C<sub>0/4</sub></b>	-0.164	0.0365	8	±5
<b>C<sub>0/8</sub></b>	-0.165	0.0356	8	±1
<b>C<sub>0/16</sub></b>	-0.162	0.0383	9	±1
<b>C+</b>	-0.168	0.0328	7	±1
<b>C-</b>	0.239	0.439	100	±5
<b>C<sub>CM</sub></b>	-0.200			

*Tabela 4.8 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade ao composto dibutilftalato.*

<b>Amostra</b>	<b>Absorvância Média</b>	<b>Absorvância Final</b>	<b>Viabilidade Relativa (%)</b>	<b>Incerteza Padrão</b>
<b>C<sub>0</sub></b>	-0.0840	0.106	16	±1
<b>C<sub>0/2</sub></b>	0.000750	0.191	29	±2
<b>C<sub>0/4</sub></b>	0.152	0.341	51	±6
<b>C<sub>0/8</sub></b>	0.260	0.450	67	±8
<b>C<sub>0/16</sub></b>	0.457	0.646	97	±2
<b>C+</b>	-0.171	0.0190	3	±0
<b>C-</b>	0.477	0.666	100	±2
<b>C<sub>CM</sub></b>	-0.190			

Relativamente aos resultados dos materiais estudados individualmente, claramente se pode afirmar que o material HAp é não citotóxico, apresentando valores de viabilidade relativa normalizada todos superiores a 90% com incertezas entre 1-5%, para todas as concentrações estudadas. Já em comparação com o composto 2-butoxietanol, este é severamente citotóxico, uma vez que apresenta valores inferiores a 50% para todas as concentrações analisadas. Com efeito, também se pode verificar que o número de células no poço C- é inferior comparativamente aos poços C- da HAp e do composto DBP, visto que a absorvância média é menor. Pela análise da Tabela 4.8, o composto DBP é severamente citotóxico para concentrações iniciais (C<sub>0</sub> e C<sub>0/2</sub>), moderadamente citotóxico para as concentrações C<sub>0/4</sub> e C<sub>0/8</sub> e, por último, o composto é não citotóxico para a concentração mais diluída (C<sub>0/16</sub>).

## Conclusões e Perspetivas Futuras

### 5.1 Conclusões

A presente dissertação foi desenvolvida com o intuito de desenvolver substitutos ósseos baseados em compósitos auxéticos com gradientes de funcionalidade, tendo em consideração estudos anteriores, em que biomateriais como a hidroxiapatite e a policaprolactona apresentam enorme sucesso em processos de bioatividade e de biocompatibilidade.

Considerando o objetivo final, iniciou-se o projeto com o desenho da estrutura auxética 3D com o gradiente de densidades pretendido. Tendo em conta que o objetivo inicial era imprimir uma pasta pelo método de extrusão direta, teve-se que optar por outro método, uma vez que o *software Voxelizer 2*, derivado da impressora *ZMorph VX*, não autoriza a importação de modelos 3D de estruturas irregulares, ou seja, não permite a impressão de peças que apresentem *layers* de diferentes geometrias/formatos. Assim, optou-se pelo método de deposição de material fundido para a criação de moldes da estrutura pretendida. Estes moldes, produzidos em PVA, são o negativo das nossas peças e permitem a injeção de pasta pelos canais da estrutura.

Em seguida, procedeu-se à produção de pasta à base de HAp e PCL, recorrendo à utilização dos seguintes solventes como diclorometano, 2-butoxietanol e dibutilftalato. Contudo, esta pasta teve de ser várias vezes otimizada, realizando 5 formulações até se atingir a formulação ideal. Esta última é composta por uma composição sólida de 70 % de HAp e 30% de PCL, em wt%, e uma composição de solventes de DCM, 2-Bu e DBP, na seguinte proporção 10:4:2. É importante mencionar que para produzir peças homogéneas, sem fissuras e resistentes à compressão, deve-se deixar evaporar entre 65-70% do DCM, antes de proceder à injeção de pasta nos moldes.

Relativamente aos ensaios de reologia, pode-se concluir que a pasta obtida apresenta um comportamento reofluidificante, isto é, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de corte. Com efeito, conclui-se que este comportamento é igual, independentemente da formulação testada. Conclui-se ainda que, quando DCM evapora cerca de 65-70% da sua massa, no caso de altas taxas de corte, a pasta torna-se mais viscosa quanto maior for a percentagem de polímero na sua composição e, no caso de baixas taxas de corte, as curvas de fluxo comportam-se de igual maneira, independentemente da sua formulação.



Com a realização de ensaios de compressão uniaxiais às estruturas auxéticas, com diferentes espessuras de parede, pode-se concluir que as peças produzidas apresentam comportamento elástico e tensões de colapso de 0.340, 0.567 e 0.891 MPa, dependendo da espessura das estruturas. Com efeito, existe uma dependência entre a tensão de colapso e a espessura, no qual se pode afirmar que quanto maior for esta espessura, maior a tensão de colapso das estruturas. Através destes ensaios também se pode concluir que quanto mais denso for a estrutura mais rapidamente se dá a extensão referente à zona de densificação de cada estrutura.

Prosseguiu-se o estudo com ensaios de bioatividade, nos quais foi possível, por análise SEM e EDS, concluir que as amostras, após 24 horas de imersão em SBF já se identifica uma ligeira camada de precipitação de HCA. Passados 3 e 7 dias pode-se verificar que ocorreu a precipitação de cristais apatíticos nas superfícies das amostras e, por conseguinte, conclui-se que as amostras são bioativas.

Por fim, efetuaram-se testes de citotoxicidade que permitiram concluir que, para todas as concentrações testadas, o material compósito produzido é não citotóxico. Contudo, sendo que se está perante solventes tóxicos, as amostras têm de ser bem secas, garantindo a libertação dos compostos menos voláteis (2-butoxietanol e dibutilftalato), de modo a não colocar em causa a cultura celular.

## 5.2 Perspetivas Futuras

O trabalho de investigação, por definição, é um processo de constante aprendizagem e de contínuo desenvolvimento, pelo que tendo em vista o melhorar deste mesmo trabalho, é necessário proceder-se a otimizações e a mais estudos posteriores. Neste sentido, seria importante:

- Desenhar um biomaterial auxético tridimensional que imite integralmente a forma circular de uma secção da diáfise de um osso longo;
- Realizar ensaios mecânicos que determinem o coeficiente de Poisson das estruturas produzidas e, por conseguinte, recalculer os seus módulos de Young;
- Realizar um estudo relativo à secagem das amostras e libertação de compostos voláteis das mesmas ao longo do tempo;
- Realizar estudos em culturas celulares *in vitro*, nomeadamente ensaios de adesão celular e proliferação celular, de modo a perceber a biocompatibilidade das amostras produzidas.

## Referências Bibliográficas

---

- [1] L. T. Kuhn, K. Merritt, and S. Brown, “Biomaterials,” in *Introduction to Biomedical Engineering*, 3rd ed., Elsevier, 2012, pp. 219–271.
- [2] A. S. Figueiredo, L. C. Takita, and S. Goldenberg, “Comparação entre a hidroxiapatita porosa de coral e o enxerto ósseo autógeno em coelhos,” *Acta Cir.*, vol. 12, no. 2, pp. 84–88, 1997.
- [3] A. S. Greenwald, S. D. Boden, V. M. Goldberg, Y. Khan, C. T. Laurencin, and R. N. Rosier, “Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions, and Applications,” *J. BONE Jt. SURGERY, Inc.*, vol. 83, no. 2, pp. 98–103, 2001.
- [4] M. Böhner, “Resorbable biomaterials as bone graft substitutes,” *Mater. Today*, vol. 13, no. 1–2, pp. 24–30, 2010.
- [5] E. Gonçalves, “Scaffolds Inteligentes e Reforçados para Medicina Regenerativa Óssea,” Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2012.
- [6] R. Landers, A. Pfister, U. Hübner, H. John, R. Schmelzeisen, and R. Mülhaupt, “Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques,” *J. Mater. Sci.*, vol. 37, no. 15, pp. 3107–3116, 2002.
- [7] E. Sachlos, J. T. Czernuszka, S. Gogolewski, and M. Dalby, “Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 5, pp. 29–40, 2003.
- [8] T. Kuhnt and S. Camarero-Espinosa, “Additive manufacturing of nanocellulose based scaffolds for tissue engineering: Beyond a reinforcement filler,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 252, pp. 117–159, 2021.
- [9] T. Wohlers, “Additive manufacturing and 3D printing state of the industry,” *Wohlers Assoc. Fort Collins, CO*, vol. 6, pp. 269–375, 2013.
- [10] T. Wohlers, “WOHLERS REPORT 2019: 3D Printing and Additive Manufacturing State of the Industry,” Wohlers Associates, 2019.
- [11] T. Wohlers, “WOHLERS REPORT 2020: 3D Printing and Additive Manufacturing Global State of the Industry,” 2020.
- [12] A. Gisario, M. Kazarian, F. Martina, and M. Mehrpouya, “Metal additive manufacturing in the commercial aviation industry: A review,” *J. Manuf. Syst.*, vol. 53, pp. 124–149, 2019.
- [13] T. D. Szucs, “Production of Hard Tissue Scaffolds Using Three-Dimensional Printing Method. This thesis is submitted as the fulfilment for the requirement of the award of degree of Master of Engineering,” MSc thesis, Dublin City University, 2008.
- [14] A. Y. P. Mateus, “Development , Characterisation and Application of Calcium Phosphates Nanocrystals Aggregates in a Collagen Matrix to be used as Biomaterial in Bone Regeneration,” *Matrix*, no. April, p. 193, 2010.
- [15] J. T. Gerard, *Corpo Humano Fundamentos de Anatomia e Fisiologia*, 4th ed. Porto Alegre: Médicas, Artes, 2000.
- [16] R. R. Seeley, P. Tate, and T. D. Stephens, *Anatomia & Fisiologia*, 8th ed. Lusociência - Edições Técnicas e Científicas, 1998.
- [17] T. Montanari, “Tecido ósseo,” in *Histologia: Texto, atlas e roteiro para aulas práticas.*, 3rd ed., Porto Alegre: Tatiana Montanari, 2016, pp. 64–70.
- [18] G. J. Tortora and B. Derrickson, “THE SKELETAL SYSTEM,” in *Principles of Anatomy & Physiology*, 14th ed., J. Wiler & Sons Inc, Ed. 2014, pp. 169–277.

- [19] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, "Bone tissue engineering: State of the art and future trends," *Macromol. Biosci.*, vol. 4, no. 8, pp. 743–765, 2004.
- [20] I. Dias, "Estudo da eficiência da deposição de carga superficial em revestimentos à base de hidroxiapatite.," Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2017.
- [21] L. S. O. Pires, "Biocerâmicos e Biovidros para prototipagem 3D: propriedades e formulações," Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2011.
- [22] D. C. Andia, P. S. Cerri, and L. C. Spolidorio, "Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos," *Rev. Odontol.*, vol. 35, no. 2, pp. 191–198, 2006.
- [23] L. C. U. Junqueira and J. Carneiro, "Tecido Ósseo," in *Histologia Básica - Texto e atlas*, 12th ed., Guanabara Koogan., 2013, pp. 132–150.
- [24] I. Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil, M. A. Alobera Gracia, M. Del Canto Pingarrón, and L. Blanco Jerez, "Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue," *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, vol. 11, pp. 32–36, 2006.
- [25] P. S. P. Batista, "Nova abordagem terapêutica para a regeneração do Osso," Tese de Doutorado, Universidade da Beira Interior, 2013.
- [26] A. Esteves, "Estudo das Propriedades Elétricas de Filmes de Quitosano e Quitosano/Hidroxiapatite para Possíveis Aplicações em Implantes ósseos," Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2016.
- [27] A. Butscher, M. Böhner, S. Hofmann, L. Gauckler, and R. Müller, "Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 3, pp. 907–920, 2011.
- [28] H. Alobeedallah, J. L. Ellis, R. Rohanizadeh, H. Coster, and F. Dehghani, "Preparation of Nanostructured Hydroxyapatite in Organic Ivents for Clinical Applications," *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 25, no. 1, pp. 12–19, 2011.
- [29] L. J. Gibson and M. F. Ashby, *Cellular Solids – structure and properties*, 2nd ed. Press, Cambridge University, 1997.
- [30] T. S. Keller, D. M. Spengler, and D. R. Carter, "Geometric, elastic, and structural properties of maturing rat femora," *J. Orthop. Res.*, vol. 4, pp. 57–67, 1986.
- [31] C. H. Turner and D. B. Burr, "Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial," *Bone*, vol. 14, no. 4, pp. 595–608, 1993.
- [32] F. Fonseca and A. Completo, *Fundamentos De Biomecânica: MÚSCULO-ESQUELÉTICA E ORTOPÉDICA*, 10th ed. PUBLINDUSTRIA, 2011.
- [33] R. Magalhães, "Desenvolvimento de Materiais Auxéticos para Aplicações Estruturais," Tese de Mestrado, Universidade do Minho, 2015.
- [34] A. A. White, S. M. Best, and I. A. Kinloch, "Hydroxyapatite-carbon nanotube composites for biomedical applications: A review," *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–13, 2007.
- [35] C. Y. Pan, P. H. Liu, Y. C. Tseng, S. T. Chou, C. Y. Wu, and H. P. Chang, "Effects of cortical bone thickness and trabecular bone density on primary stability of orthodontic mini-implants," *J. Dent. Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 383–388, 2019.
- [36] H. Devlin, K. Horner, and D. Ledgerton, "A comparison of maxillary and mandibular bone mineral densities.," *J. Prosthet. Dent.*, vol. 79, no. 3, pp. 323–327, 1998.
- [37] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011.

- [38] J. Park and R. S. Lakes, "Introduction," in *Biomaterials: an introduction*, 3rd ed., Springer Science & Business Media, 2007, pp. 1–16.
- [39] B. A. Allo, D. O. Costa, S. J. Dixon, K. Mequanint, and A. S. Rizkalla, "Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration," *J. Funct. Biomater.*, vol. 3, no. 2, pp. 432–463, 2012.
- [40] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *BIOMATERIALS SCIENCE: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, 2004.
- [41] L. L. Hench, "Bioceramics: from concept to clinic. J Am Ceram Soc. 1993;72:93-98.," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 74, pp. 1487–1510, 1991.
- [42] M. Ceramics and V. A. Dubok, "BIOCERAMICS - YESTERDAY, TODAY, TOMORROW.," *Powder Metall. Ceram.*, vol. 39, no. 414, pp. 381–394, 2001.
- [43] D. Bayraktar and A. C. Tas, "Chemical preparation of carbonated calcium hydroxyapatite powders at 37°C in urea-containing synthetic body fluids," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 19, no. 13–14, pp. 2573–2579, 1999.
- [44] J. P. Gittings, C. R. Bowen, A. C. E. Dent, I. G. Turner, F. R. Baxter, and J. B. Chaudhuri, "Electrical characterization of hydroxyapatite-based bioceramics," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 2, pp. 743–754, 2009.
- [45] A. C. F. M. Costa, M. G. Lima, L. H. M. A. Lima, V. V Cordeiro, and K. M. S. Viana, "Hidroxiapatita : Obtenção, caracterização e aplicações.," *Revista Eletrônica de Materiais e Procse*, vol. 4.3, pp. 29–38, 2009.
- [46] A. Sofia, "Elétrica No Crescimento De Implantes Ósseos.," Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2011.
- [47] T. Matsumoto, M. Okazaki, A. Nakahira, J. Sasaki, H. Egusa, and T. Sohmura, "Modification of Apatite Materials for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery Carriers.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 14, no. 1, pp. 2726–2733, 2007.
- [48] D. S. Jones, J. Djokic, and S. P. Gorman, "The resistance of polyvinylpyrrolidone-Iodine-poly( $\epsilon$ -caprolactone) blends to adherence of Escherichia coli," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 2013–2020, 2005.
- [49] W. Amass, A. Amass, and B. Tighe, "A review of biodegradable polymers: Uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies," *Polym. Int.*, vol. 47, no. 2, pp. 89–144, 1998.
- [50] L. Jiang and J. Zhang, "Biodegradable and Biobased Polymers," in *Applied Plastics Engineering Handbook*, 2nd ed., Elsevier Inc., 2017, pp. 127–143.
- [51] V. A. Tavares, "Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos.," Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2011.
- [52] V. R. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, and A. Trehan, "Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview," *Int. J. Pharm.*, vol. 278, no. 1, pp. 1–23, 2004.
- [53] S. Eshraghi and S. Das, "Mechanical and microstructural properties of polycaprolactone scaffolds with one-dimensional, two-dimensional, and three-dimensional orthogonally oriented porous architectures produced by selective laser sintering," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 7, pp. 2467–2476, 2010.
- [54] A. Cipitria, A. Skelton, T. R. Dargaville, P. D. Dalton, and D. W. Hutmacher, "Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - A review," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 26, pp. 9419–9453, 2011.
- [55] R. Dwivedi *et al.*, "Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature," *J. Oral Biol. Craniofacial Res.*, vol. 10, no. 1, pp. 381–388, 2020.
- [56] C. A. Pettigrew, G. A. Rece, M. C. Smith, and L. W. King, "Aerobic Biodegradation of Synthetic and

Natural Polymeric Materials: A Component of Integrated Solid-Waste Management,” *J. Macromol. Sci. Part A*, vol. 32, no. 4, pp. 811–821, 1995.

- [57] R. Lakes, “Foam Structures with a Negative Poisson’s Ratio,” *Science* (80- ), vol. 235, pp. 1038–1040, 1986.
- [58] K. E. Evans, “Auxetic polymers: a new range of materials,” *Endeavour*, vol. 15, no. 4, pp. 170–174, 1991.
- [59] A. Love, “A treatise on the mathematical theory of elasticity,” vol. 1. Cambridge: at the University Press, 1982.
- [60] J. Gleick, “A PERVERSE CREATION OF SCIENCE: ANTI-RUBBER,” *New York Times*, no. C, p. 8, 1987.
- [61] G. W. Milton, “Composite materials with poisson’s ratios close to - 1,” *J. Mech. Phys. Solids*, vol. 40, no. 5, pp. 1105–1137, 1992.
- [62] K. E. Evans and A. Alderson, “Auxetic materials: Functional materials and structures from lateral thinking!,” *Adv. Mater.*, vol. 12, no. 9, pp. 617–628, 2000.
- [63] R. C. Hibbeler, *Resistência de Materiais*, 5th ed. Pearson Education Inc, Prentice Hall, 2004.
- [64] Q. Liu, “Literature review: materials with negative poisson’s ratios and potential applications to Aerospace and Defence,” *Aust. Gov. Dep. Def.*, pp. 1–47, 2006.
- [65] L. C. Cossolino and A. H. A. Pereira, “Módulos elásticos: visão geral e métodos de caracterização,” *Informativo Técnico-Científico ITC-ME/ATCP*, no. Cossolino LC. p. 30, 2010.
- [66] F. Steffens, “Desenvolvimento de estruturas fibrosas com comportamento auxético,” Tese de Doutorado, Universidade do Minho, 2015.
- [67] S. M. Sajadi *et al.*, “Multiscale Geometric Design Principles Applied to 3D Printed Schwarzites,” *Adv. Mater.*, vol. 30, no. 1, pp. 1–8, 2018.
- [68] C. Soyarslan, V. Blümer, and S. Bargmann, “Tunable auxeticity and elastomechanical symmetry in a class of very low density core-shell cubic crystals,” *Acta Mater.*, vol. 177, pp. 280–292, 2019.
- [69] D. Li, W. Liao, N. Dai, G. Dong, Y. Tang, and Y. M. Xie, “Optimal design and modeling of gyroid-based functionally graded cellular structures for additive manufacturing,” *CAD Comput. Aided Des.*, vol. 104, pp. 87–99, 2018.
- [70] Z. Qin, G. S. Jung, M. J. Kang, and M. J. Buehler, “The mechanics and design of a lightweight three-dimensional graphene assembly,” *Sci. Adv.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [71] J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, no. 2, pp. 92–102, 1998.
- [72] S. A. Souza, *Ensaio Mecânicos de Materiais Metálicos*, 3rd ed. Blucher, Edgard, 1974.
- [73] C. A. G. M. Branco, *Mecânica dos Materiais*, 4th ed. Gulbenkian, Fundação Calouste, 2006.
- [74] S. . SOUZA, *Ensaio mecânicos de materiais metálicos-fundamentos teóricos e práticos.*, 5th ed. 1982.
- [75] H. P. Degischer and B. Kriszt, *Handbook of Cellular Metals: Production, Processing, Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002.
- [76] I. M. A. Duarte, “Espumas metálicas: processo de fabrico, caracterização e simulação numérica,” Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2005.
- [77] J. M. Sobral, S. G. Caridade, R. A. Sousa, J. F. Mano, and R. L. Reis, “Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 3, pp. 1009–1018, 2011.

- [78] T. Gornet and T. Wohlers, “History of Additive Manufacturing, Introduction of non- SL systems Introduction of low-cost 3D printers.,” Wohlers Associates, Inc., 2014.
- [79] K. F. Leong, C. M. Cheah, and C. K. Chua, “Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2363–2378, 2003.
- [80] P. I. P. Soares, J. Romão, R. Matos, J. C. Silva, and J. P. Borges, “Design and engineering of magneto-responsive devices for cancer theranostics: Nano to macro perspective,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 116, no. 100742, 2021.
- [81] W. Y. Yeong, C. K. Chua, K. F. Leong, and M. Chandrasekaran, “Rapid prototyping in tissue engineering: Challenges and potential,” *Trends Biotechnol.*, vol. 22, no. 12, pp. 643–652, 2004.
- [82] L. Geng, Y. S. Wong, D. W. Hutmacher, W. Feng, H. T. Loh, and J. Y. H. Fuh, “Rapid Prototyping of 3D Scaffolds for Tissue Engineering Using a Four-Axis Multiple-Dispenser Robotic System.” pp. 423–432, 2003.
- [83] C. Mota, D. Puppi, F. Chiellini, and E. Chiellini, “Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs.,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 9, no. 3, pp. 174–190, 2012.
- [84] C. Mota, S. Camarero-Espinosa, M. B. Baker, P. Wieringa, and L. Moroni, “Bioprinting: From Tissue and Organ Development to in Vitro Models,” *Chem. Rev.*, 2020.
- [85] F. L. Marten, “Vinyl Alcohol Polymers,” in *The Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, vol. 8, 4th Ed., Ed. John Wiley & Sons, 2002, pp. 399–437.
- [86] S. Amelinckx, D. van Dyck, J. van Landuyt, and G. van Tendeloo, “Chapter 2: Scanning Beam Methods,” in *Electron Microscopy: Principles and Fundamentals.*, Wiley VCH, 1997, pp. 305–498.
- [87] R. Osório, “Estudo da influência na bioactividade da adição de materiais piezoelétricos ( BaTiO 3 ) a hidroxiapatite para implantes ósseos,” Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [88] D. C. Goldstein, Joseph I and Newbury, Dale E and Michael, Joseph R and Ritchie, Nicholas WM and Scott, John Henry J and Joy, *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis.*, 4th ed. Springer, 2017.
- [89] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [90] I. O. for Standardization, *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO Standard No. 10993:1999).* 1999.
- [91] K. Präbst, H. Engelhardt, S. Ringgeler, and H. Hübner, “Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin.,” in *Cell Viability Assays. Methods in Molecular Biology*, vol. 1601, New York: Humana Press, 2017, pp. 1–17.
- [92] K. Deshmukh, M. Basheer Ahamed, R. R. Deshmukh, S. K. Khadheer Pasha, P. R. Bhagat, and K. Chidambaram, “Biopolymer Composites with High Dielectric Performance: Interface Engineering,” in *Biopolymer Composites in Electronics*, Elsevier Inc., 2017, pp. 27–128.
- [93] P. J. Sherratt, S. Williams, J. Foster, N. Kernohan, T. Green, and J. D. Hayes, “Direct comparison of the nature of mouse and human GST T1-1 and the implications on dichloromethane carcinogenicity,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 179, no. 2, pp. 89–97, 2002.
- [94] A. E. Jakus *et al.*, “Hyperelastic ‘bone’: A highly versatile, growth factor-free, osteoregenerative, scalable, and surgically friendly biomaterial,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, no. 358, pp. 1–16, 2016.
- [95] N. Yang, “Dichloromethane,” in *Encyclopedia of Toxicology*, 3rd ed., vol. 2, A. Press, Ed. Manchester University, Fort Wayne, IN, USA: Elsevier Inc., 2014, pp. 99–101.
- [96] H. A. Barnes, “CHAPTER 9: SHEAR-THINNING LIQUIDS.,” in *A HANDBOOK OF ELEMENTARY RHEOLOGY.*, The University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics., 2000, pp. 55–

- [97] A. F. Bastawros, H. Bart-Smith, and A. G. Evans, “Experimental analysis of deformation mechanisms in a closed-cell aluminum alloy foam,” *J. Mech. Phys. Solids*, vol. 48, no. 2, pp. 301–322, 2000.
- [98] D. HERTZ, “An analysis of rubber under strain from an engineering perspective,” *Elastomerics*, vol. 123, no. 12, pp. 14–21, 1991.
- [99] A. H. Muhr, “Properties of Rubber Compounds for Engineering Applications,” *J. Nat. Rubber Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 14–37, 1992.
- [100] A. N. GENT, *Rubber Elasticity: Basic Concepts and Behavior*. ACADEMIC PRESS, INC., 1978.
- [101] M. Bohner and J. Lemaitre, “Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 12, pp. 2175–2179, 2009.
- [102] J. Zhao, Y. Liu, W. Bin Sun, and H. Zhang, “Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry,” *Chem. Cent. J.*, vol. 5, no. 40, pp. 1–7, 2011.
- [103] L. Riss, T. L., Niles, A. L., & Minor, “Cell Viability Assays,” in *Assay Guidance Manual*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004, pp. 1–23.

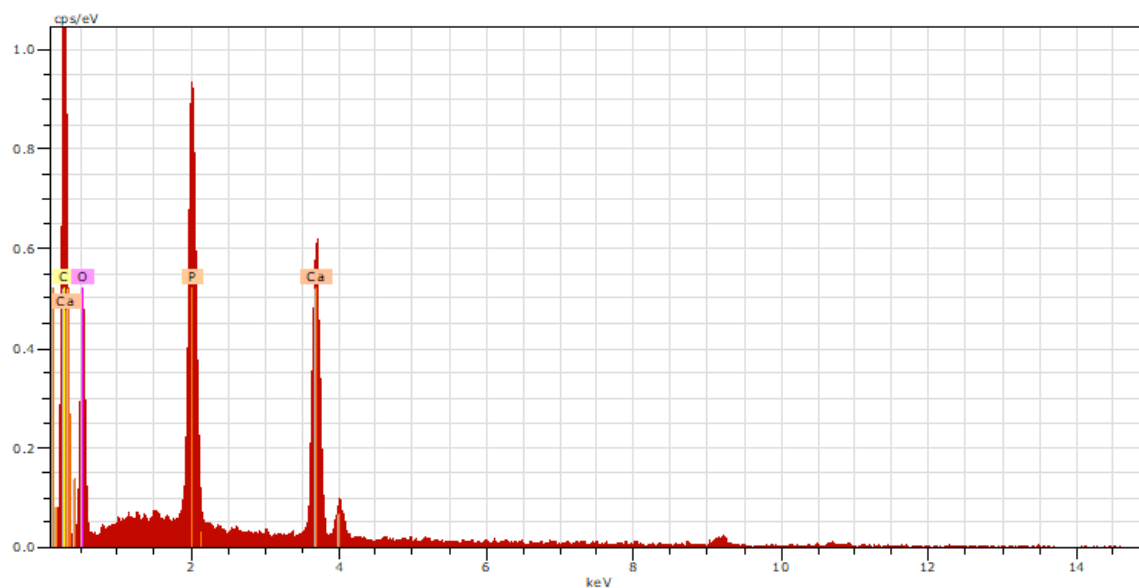


Figura 7.1 - Espectro retirado por EDS da amostra Controlo.

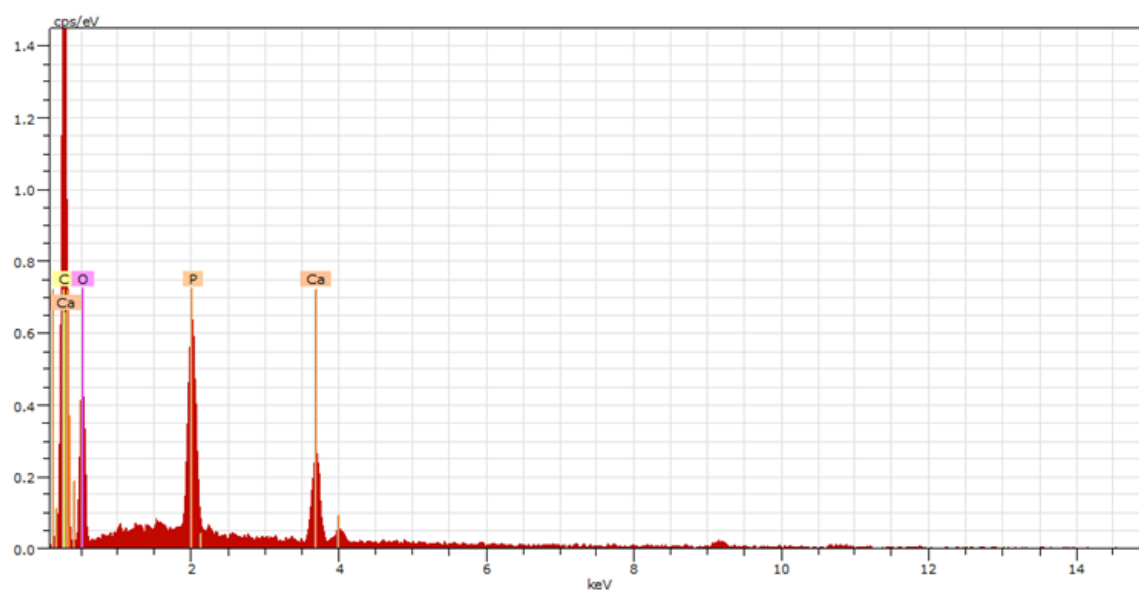


Figura 7.2 - Espectro retirado por EDS da amostra imersa durante 24 horas.



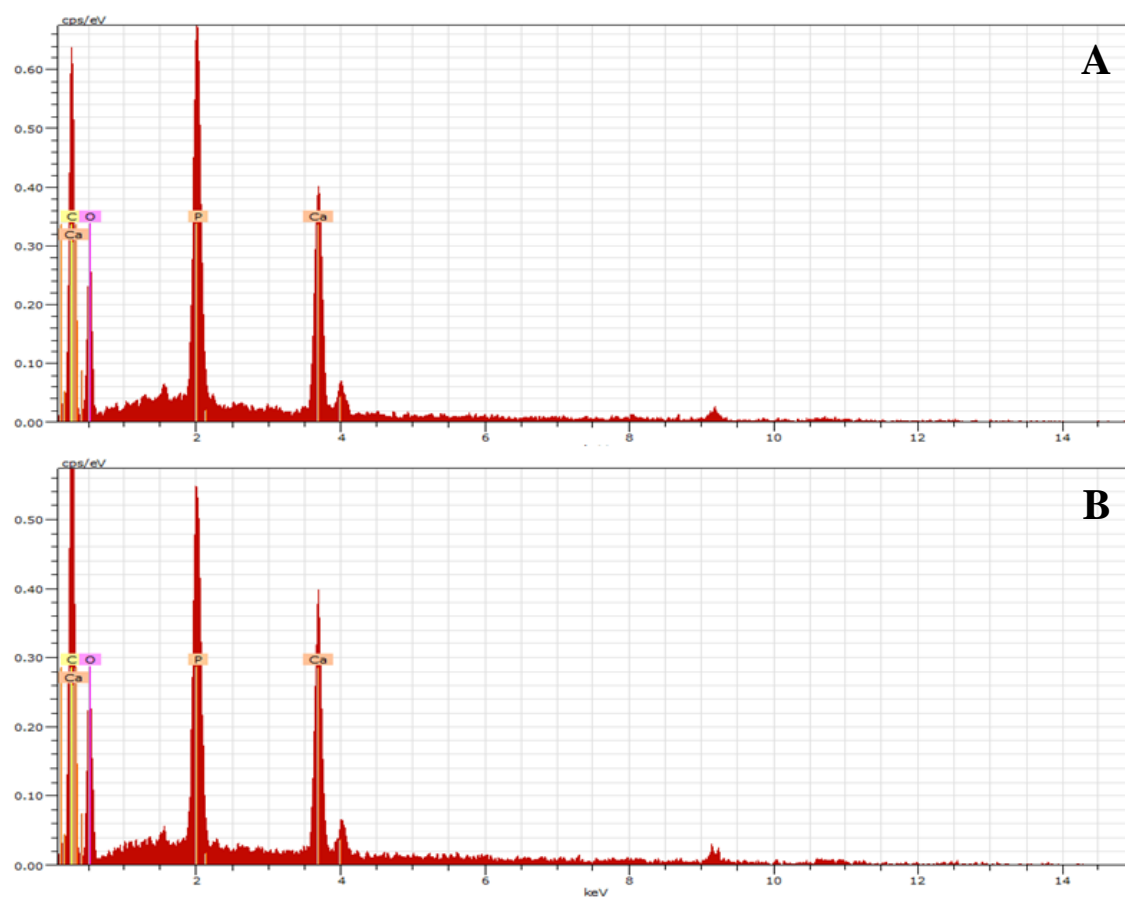


Figura 7.3 - Espectro retirado por EDS da amostra imersa durante (A) 3 e (B) 7 dias.